

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2000.08.08

申 请 号： 00122631.2

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 微流体系统中实体分子的操纵方法及相关试剂盒

申 请 人： 清华大学 北京博奥生物芯片有限责任公司

发明创造人： 程京、许俊泉、王小波、吴镭、杨卫平



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2004 年 11 月 19 日

权 利 要 求 书

1. 一种应用于微流体系统中用于操纵实体分子的方法，包括：
 - a) 将待操纵的实体分子结合到一结合体的表面形成实体分子-结合体复合体；
 - b) 以芯片形式产生的物理力对实体分子-结合体复合体进行操纵，其中操纵是通过芯片外结构和芯片内结构相结合作用得到的。
由此所述实体分子被操纵。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的待被操纵的实体分子包括细胞、细胞器、病毒、分子或它们的聚合物或复合体。
3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述的细胞包括动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞和重组细胞。
4. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述的细胞器包括细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、ER、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体。
5. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述的分子包括无机分子，有机分子或它们的复合体。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述的无机分子包括钠、钾、镁、钙、氯、铁、铜、锌、锰、钴、碘、钼、钒、镍、铬、氟、硅、锡、硼或砷离子。
7. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述的有机分子包括氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖，碳水化合物、脂类或它们的复合体。
8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的结合体包括细胞、细胞器、病毒、微粒、分子的聚合物或复合体、或它们的聚合物或复合体。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述的细胞包括动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞和重组细胞。

10. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述的细胞器包括细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、ER、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体。

11. 根据权利要求 8 所述的方法，其中微粒的尺寸在 0.01 微米到几千微米。

12. 根据权利要求 8 所述的方法，其中微粒可以是塑料微粒、聚苯乙烯微珠体、玻璃珠体、磁珠、中空的玻璃球、金属颗粒、具有复杂的成分的微料、或各种微加工出来的独立微结构。

13. 根据权利要求 1 所述的方法，其中实体分子是通过连接物直接与结合体的表面相连。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中连接物是可切割连接物。

15. 根据权利要求 1 所述的方法，其中实体分子是通过共价的或非共价的连接臂与结合体的表面相连。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中实体分子与结合体表面之间的连接物是特异的或非特异的连接。

17. 根据权利要求 15 所述的方法，其中实体分子与结合体表面之间的连接物是可切割的连接物。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中的连接物是化学、物理或酶可切割的。

19. 根据权利要求 1 所述的方法，其中的物理力包括介电电泳力、行波介电电泳力、磁力、声波力、静电力、机械力和光辐射力。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中介电电泳力或行波介电电泳力是电极产生的电场激发的。

21. 根据权利要求 19 所述的方法，其中磁力是通过铁磁材料产生的磁场激发的。

22. 根据权利要求 19 所述的方法，其中磁力是通过微电磁单元产生的磁场激发的。

23. 根据权利要求 19 所述的方法，其中声波力是通过驻波声场或行波声场来产生的。

24. 根据权利要求 19 所述的方法，其中声波力是通过压电材料产生的声场激发的。

25. 根据权利要求 19 所述的方法，其中静电力是通过直流电场来产生的。

26. 根据权利要求 19 所述的方法，其中机械力是流体流动产生的作用力。

27. 根据权利要求 19 所述的方法，其中光辐射力是通过激光钳来产生的。

28. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中所述的芯片可以是二氧化硅、氮化硅、塑料、玻璃、陶瓷、光刻胶或橡胶芯片。

29. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中芯片外的结构是一个能量源，用于产生如介电电泳力、磁力、声波力、静电力、机械力和光辐射力的物理力。

30. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中芯片内结构包括多个微单元，每个单元被激发并与外部结构结合作用，可以对结合体产生一个物理力，该芯片内结构还包括可选择性地激发各单元的装置。

31. 据权利要求 1 中所述的方法，其中所述的芯片内结构包括一个单个的单元，当被激发并与芯片外结构结合时可对结合体产生物理作用力。

32. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中所述的操纵包括输送、聚集、富集、浓缩、聚合、俘获、排斥、悬浮、分离、隔离或实体分子的线性的或其它导引的运动。

33. 根据权利要求 1 中所述的方法，进一步还包括在实体分子被操纵完后将其从结合体表面分离下来的步骤。

34. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子是 DNA，结合体是非致密的珠体，在高盐浓度的缓冲液中，DNA 可逆地吸附在非致密珠体的表面上。

35. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子是 DNA 并且该 DNA 通过序列特异性杂交或与抗 DNA 抗体结合的方式结合到结合体的表面上。

36. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子是 mRNA 并且该 mRNA 特异地结合到表面修饰有聚胸腺嘧啶的结合体的表面上。

37. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子是蛋白并且该蛋白非特异地结合到表面经洗涤剂修饰过的结合体的表面上。

38. 根据权利要求 37 中所述的方法，其中的洗涤剂是 SDS。

39. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子是蛋白并且该蛋白特异地结合到表面修饰有识别该蛋白的抗体的结合体的表面上。

40. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子不是直接被介电电泳力操纵。

41. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子不是直接被行波介电电泳力操纵。

42. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子不是直接被磁力操纵。

43. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子不是直接被声波力操纵。

44. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子不是直接被静电力操纵。

45. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中实体分子不是直接被光辐射力操纵。

46. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中被操纵的实体分子是充分结合在结合体的表面上。

47. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中被操纵的实体分子是完全结合在结合体的表面。

48. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中的物理力不是磁力。

49. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中所述的物理力可以是介电电泳力、行波介电电泳力、声波力、静电力、机械力或光辐射力。

50. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中多个实体分子被操纵。

51. 根据权利要求 50 中所述的方法，其中所述的多个实体分子被操纵是通过操纵相应的结合体来实现的。

52. 根据权利要求 50 中所述的方法，其中所述的多个实体分子是顺序或同时被操纵的。

53. 一种用于分离靶细胞内实体分子的方法，包括：

a) 将生物样品中待分离的靶细胞与对应的第一类靶细胞结合体结合形成靶细胞—结合体复合体；

b) 通过芯片形式的物理力分离靶分子—结合体复合体，其中所述的分离是通过结合在芯片上的一个外部结构和芯片内结构的组合来实现的；

c) 从分离的靶细胞中获得细胞内实体分子；

d) 将获得的细胞内实体分子结合在所述细胞内实体分子的第二类结合体表面形成细胞内实体分子—结合体复合体；

e) 通过芯片形式的物理力分离胞内实体分子—结合体复合体，其中所述的分离是通过结合在芯片上的一个外部结构和芯片内结构的组合来实现的。

54. 根据权利要求 53 中所述的方法，其中所述的生物样品是一体液。

55. 根据权利要求 53 中所述的方法，还包括在从分离的靶细胞中获得细胞内实体分子前将第一类结合体从靶细胞—结合体复合体上分离开的步骤。

56. 根据权利要求 53 中所述的方法，还包括将得到的细胞内实体分子传输到一个新的场所以供将该得到的细胞内实体分子结合到第二类结合体的表面的步骤。

57. 根据权利要求 53 中所述的方法，还包括将细胞内实体分子一结合体复合体传输到一个新的场所以供分离该细胞内实体分子一结合体复合体的步骤。

58. 根据权利要求 53 中所述的方法，还包括检测分离的细胞内实体分子一结合体复合体的步骤。

59. 根据权利要求 58 中所述的方法，还包括传输所分离的细胞内实体分子一结合体复合体到一个新的场所以供检测细胞内实体分子一结合体复合体。

60. 根据权利要求 53 中所述的方法，还包括将细胞内实体分子从分离后的细胞内实体分子一结合体上分离开并对所分离的细胞内实体分子进行检测的步骤。

61. 根据权利要求 60 中所述的方法，还包括传输所分离的细胞内实体分子到一个新的场所以供检测该细胞内实体分子的步骤。

62. 一种构建用在微流体方面的 cDNA 库的方法，包括：

a) 将待分离的靶细胞结合在所述靶细胞的第一类结合体表面形成靶细胞一结合体复合体；

b) 通过芯片形式的物理力分离靶分子一结合体复合体，其中所述的分离是通过芯片的一个外部结构和芯片内结构的组合来实现的；

c) 对分离的靶细胞进行胞解；

d) 将第一类结合体从胞解的靶细胞上分离开并去除；

e) 将待从所述胞解的靶细胞中分离的 mRNA 结合到所述 mRNA 的第二类结合体的表面形成 mRNA—结合体复合体；

f) 通过芯片形式的物理力分离 mRNA—结合体复合体，其中所述的分离是通过芯片的一个外部结构及芯片内结构的组合来实现的；

g) 将分离后的 mRNA—结合体复合体传输到另一个反应池中并对 mRNA 作反转录形成 cDNA 文库。

63. 根据权利要求 62 中所述的方法，其中所述的靶细胞是血液靶细胞。

64. 在微流体应用中用于确定靶细胞内基因表达的方法，包括：

a) 将待分离的靶细胞结合在所述靶细胞的第一类结合体表面形成靶细胞—结合体复合体；

b) 通过芯片形式的物理力分离靶细胞—结合体复合体，其中所述的分离是通过芯片的一个外部结构和芯片内结构的组合来实现的；

c) 对分离的靶细胞进行胞解；

d) 将第一类结合体从胞解的靶细胞上分离开并去除；

e) 将待从所述胞解的靶细胞中分离的 mRNA 结合到所述 mRNA 第二类结合体的表面形成 mRNA—结合体复合体；

f) 通过芯片形式的物理力分离 mRNA—结合体复合体，其中所述的分离效果是通过芯片的一个外部结构及芯片内结构的组合来实现的；

g) 确定分离出 mRNA 分子的数量；

65. 根据权利要求 64 中所述的方法，其中所述的确定分离出来 mRNA 分子的数量是通过将 mRNA 分子反转录成 cDNA 分子后，通过与芯片上互补的 DNA 分子进行杂交来确定 cDNA 分子的数量，由此得到 mRNA 分子的数量。

66. 根据权利要求 64 中所述的方法，其中所述的靶细胞是血细胞。

67. 根据权利要求 64 中所述的方法，其中所述的靶细胞可以是被药物分子或候选药物分子处理过的细胞。

68. 在微流体应用中用于操纵实体分子的试剂盒包括：

a) 一个结合体，被操纵的实体分子可以结合在该结合体表面形成实体分子—结合体复合体；

- b)用于将实体分子结合到结合体表面的装置；及
- c)一块芯片，通过结合在芯片上的一个外部结构及芯片内结构的组合产生物理力来操纵实体分子—结合体复合体。

69. 权利要求 68 中所述的试剂盒，还包括将实体分子结合在结合体表面和/或在芯片上操纵实体分子—结合体复合体的使用说明书。

说 明 书

微流体系统中实体分子的操纵方法

本发明涉及对芯片上实体分子或分子进行操纵的领域。具体来说，本发明给出一个在微流体应用场合中操纵实体分子的方法，该方法包括：1) 将一个待操纵的实体分子结合到结合体表面形成一个结合体-实体分子的复合体；2) 通过物理力在芯片上操纵结合体-实体分子复合体，其中所述的操纵是通过将芯片外的结构和芯片内的结构组合在一起作用，实现对实体分子的操纵。

近年来学术界、工业界在微流体系统领域进行了大量的研究。为实现与流体相关的各种不同功能、处理和行为，人们开发了许多微流体器件和装置。几乎所有的微流体器件都包括操纵、处理分子和微粒的功能。然而直到现在还没有一个通用的在微流体器件中操纵分子的方法。一些用于生物芯片的操纵分子的物理方法包括基于电场的介电电泳、基于光辐射力的光钳等。但是所有这些方法都有很多局限，电泳使用直流电场，而要在液体溶液中产生足够的直流电场又不产生其他效应（如表面电化学、气泡）是很困难的。电场只能使分子沿着或逆着电场的方向运动。当分子电荷较小时，几乎没有力被感应出来。最重要的是，人们不能随意地设计直流电场形状来任意产生操纵力。而且，电极极化使得超过 80% 的外加直流电压落在电极—溶液双层上，只有非常少量的外加电压真正被加在体溶液上。光辐射力能够作用于大分子（如 DNA 分子），但是难以产生 3 维、易于操纵的光学力。

尽管目前存在不少用于分子操纵的物理力，一些关键性的困难依然存在。首先，许多物理力与待操纵的微粒体积成正比。因为这些分子的尺寸相对较小，所以要直接用这些物理力对多种分子较小操

纵需要很高的场强，而且对分子作有效的操纵也几乎不可能。对介电电泳或行波介电电泳而言，高场强易引起不必要的流体流动。其次，某些物理力易在分子上产生，但是不易通过设计这些物理力的三维分布来实现对分子方便、多样性地操纵。第三，目前还没有一种通用的方法来对微流体系统和器件中的分子做有效地操纵和处理。

人们已经通过微粒来操纵生物领域中的分子。一个例子是通过磁珠从悬浮液中富集或分离核酸分子（如 mRNA 或 DNA）。典型地，分离步骤在 eppendorf 管里进行，将顺磁性颗粒与包含靶核酸分子的溶液混合。顺磁性颗粒的表面分子被修饰使得靶分子能结合在顺磁性颗粒的表面。当磁颗粒与核酸分子在 eppendorf 管里培养后，核酸分子就与顺磁性磁珠结合了。在 eppendorf 管的一侧通过一个永磁铁施加一个外加磁场，所有磁珠被收集到最靠近磁铁的管壁。然后用微样取液管将溶液吸走，同时磁珠在磁场的作用下被保留下。该步骤将磁珠留在试管中。接下来将 eppendorf 管从磁场中移走，加入新的缓冲液。当磁珠重新在溶液中悬浮时，缓冲液使得核酸分子与磁珠表面分离，再施加外加磁场抓获所有磁珠。然后使用微吸液管将溶液从试管中吸走，提取出核酸分子。近年来，类似的方法已经应用于芯片上（使用顺磁性磁珠或在芯片外使用永磁铁）。（Fan 等，Anal. Chem., 71(21):4851-9(1999)）。

美国专利 5,653,859 号给出一种分离的方法，对多个原始的微粒进行处理形成新的可改变微粒，这些新的可改变微粒相比与原始微粒其行波介电迁移性质有很大的不同，这样在同样的行波迁移电场的作用下，新的可改变的微粒与原始微粒表现出完全不同的行波介电迁移。美国专利 5,653,859 号中使用的物理力局限于行波场中的力。另外，由于这个方法是检测改变后微粒和原始微粒的不同运动，所以要使用该方法，原始微粒必须部分地转换为改变后的微粒。

综上所述，目前的操纵方法存在着以下不足：1) 因为分子尺

寸较小，而不能对多种分子直接施加有效的物理操纵力；2) 一些能在分子上产生的物理力往往在力的三维分布上受到限制。

本发明解决这些及其他相关的问题。本发明的目的之一是给出一种操纵多种实体分子（包括分子）的方法，目的之二是全面利用那些操纵实体分子的有效的力机制对实体分子进行操纵，目的之三是给出标准化的芯片上的操纵步骤，以使微芯片和附属系统的设计简单化、标准化，目的之四是通过选择具有特殊物理性质的微颗粒来扩展和提高分子操纵的能力。

本发明涉及对芯片上实体分子或分子进行操纵的领域。具体来说，本发明给出一个在微流体应用场合中操纵实体分子的方法，该方法包括：1) 将一个待操纵的实体分子结合到结合体表面形成一个结合体-实体分子的复合体；2) 通过物理力在芯片上操纵结合体-实体分子复合体，其中所述的操纵是通过将芯片外的结构和芯片内的结构组合在一起作用，实现对实体分子的操纵。

当实体分子处于某些处理如物理、化学、生物、生物物理或生物化学处理中，应用所提出的方法可在芯片上操纵任何种类的实体分子。实体分子包括能被不同物理力直接、适宜地操纵以及不能被各种物理力直接操纵，必须通过对结合体操纵来间接操纵的。在特殊的实现方式中，待操纵的实体分子包括细胞、细胞器官、病毒、分子或其他复杂混合物。可被操纵细胞包括但不限于动物、植物、菌类、细菌、重组细胞或培养细胞。可被操纵的细胞器官包括但不限于细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、Er、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体。可被操纵的分子包括无机分子（如离子）、有机分子或复合体。可被操纵的离子包括但不限于钠、钾、镁、钙、氯、铁、铜、锌、锰、钴、碘、钼、钒、镍、铬、氟、硅、锡、硼或砷离子。可被操纵的有机分子包括但不限于氨基酸、肽、蛋白质、核苷、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖，碳水化合物、脂类或其他复合体。

C /

任何结合体，或者是具有必要的亲合力和特异性能与实体分子结合，或者是可被一定的物理力操纵的，都能在本方法中应用。与那些能或不能被物理力直接操纵的实体分子不同，结合体必须能被需要的物理力操纵。一种结合体可以具有多种特性以使它能被不同的物理力操纵。结合体可以是细胞(如动物、植物、菌类、细菌或重组细胞)，可以为细胞器(如细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、Er、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体)，可以是病毒、天然微颗粒、合成的微颗粒或其他复合体。本方法所使用的微颗粒尺寸在 0.01 微米到几千微米之间，比较适合的尺寸是在 0.1 微米到几千微米之间，微粒的成分、形状和结构是任意的，只要它们的性质适于被物理力操纵即可。例如在本方法中所用的微颗粒包括但不限于塑胶颗粒、聚苯乙烯微珠体、玻璃珠体、磁珠、中空的玻璃球、金属颗粒或具有复杂的成分或各种微加工出来的结微细构的微粒等等。

待操纵的实体分子可以用任何已知的方法结合到结合体的表面上，例如可以直接地或通过一个连接（最好用可切割的连接）与结合体表面相连，也可以通过一个共价或非共价连接，或者特异或非特异结合相连。最好实体分子与结合体的表面之间的连接是可切割的连接，即能够被化学、物理或酶作用切去。结合步骤或分离步骤可以在芯片上或芯片外实现。

任何物理力都可以在本方法中应用，例如通过对微电极施加交流电产生电场使得电场内的电极化微粒产生介电电泳力或行波介电电泳力，用铁磁材料或微电磁单元激发的磁场驱动的磁场力作用在磁颗粒上，通过对压电材料施加电信号产生驻波、行波声场激发声场力作用于多种微粒，用直流电场激发的静电力作用于带电粒子，液体流动产生的机械力和光钳激发的光辐射力作用于各种不同类型的微粒等等。

本方法可以用于任何种类的芯片，例如硅、二氧化硅、氮化硅、

塑料、玻璃、陶瓷、光刻胶或橡胶芯片，也可以用于化学芯片（在其上可以进行化学反应）、生物芯片（在其上可以进行生物反应）或生物化学芯片。

本方法所使用的物理力通过芯片外或芯片内的结构来激发的。外部结构与内部结构相连，激发内部结构产生介电电泳力、磁场力、声场力、静电力、机械力或光辐射力等物理力，内部结构包括单个单元或多个单元，每个单元受到外部结构激发后能够在结合体上产生物理力，在多单元的内部结构中进一步还包括单元可被单独选通激发的方法。

本方法可用于任何操纵，包括但不限于输运、聚集、富集、浓缩、聚合、俘获、排斥、悬浮、分离、隔离或实体分子的其他线性的、直接的运动。

另一方面，本发明还给出了一个在实体分子被操纵后进一步使实体分子从结合体表面分离的步骤。分离步骤依赖于实体分子、结合体、表面修饰、操纵步骤的性质。一般地，分离步骤的反应条件与结合步骤的反应条件相反。例如，若一个实体分子在高盐浓度下与结合体结合，那么分离就在低盐浓度下进行；若结合是通过特异性的连接来实现的，则分离就要通过特异地切割连接来实现。

在一个具体实现中，待操纵的实体分子是 DNA，结合体是非致密珠体，DNA 在高盐浓度缓冲液中可逆地吸附在多孔磁珠的表面，或者是通过序列特异性杂交或与抗 DNA 的抗体结合而特异地结合在结合体（聚苯乙烯珠体）的表面。

在另一个具体实现中，待操纵的实体分子是 mRNA，该 mRNA 特异地与表面用聚胸腺嘧啶核苷酸修饰过的结合体结合。

在另一个具体实现中，待操纵的实体分子是蛋白质，该蛋白质非特异地与表面用洗涤剂（如 SDS）修饰过的结合体结合，或者与能特异识别它的抗体所修饰的结合体进行特异地结合。

在另一个具体实现中，待操纵的实体分子是细胞，该细胞特异性

地与表面用抗细胞抗体修饰过的结合体（如磁珠）结合。

在另一个具体实现中，待操纵的实体分子与结合体表面充分结合，更好的方法是待操纵的实体分子于结合体表面完全结合。

图 1 示出了结合体，如微颗粒，在芯片上操纵（或悬浮）待操纵的实体分子，如分子，其中

- A) 分子在生物芯片上的溶液中悬浮；
- B) 分子结合到微颗粒的表面上；
- C) 对生物芯片上线性的、平行的电极单元施加电信号，分子—微颗粒复合体将悬浮在芯片表面的某个高度上。

图 2 示出了用于承载实体分子（如分子）的流体池，该流体池包括在底部的一个生物芯片，一个环行垫片及一个盖玻片。利用了介电电泳力对分子进行操纵。

图 3 示出了用于介电电泳操纵由结合体和实体分子所构成的复合体（如分子—分子颗粒复合体）的电极结构，

图 4 示出了对实体分子（如分子）进行声操纵的流体池。流体池包括底部的压电传感器单元，环行垫片，顶部反射盖片。

图 5 示出了通过对由结合体—实体分子复合体，或对分子—微粒复合体作行波介电电泳来使实体分子（如分子）平动的电极结构。这里使用了线性、并行电极阵列，其中

- A) 电极阵列俯视图，分子—微颗粒复合体在电极上；
- B) 电极阵列截面图，分子—微颗粒复合体受到行波介电电泳力的作用；
- C) 电极阵列截面图，分子—微颗粒复合体被传送到电极阵列的末端。

图 6 示出了用于聚焦、传送、隔离和引导实体分子（如分子）的电极结构，例如通过对结合体和实体分子构成的复合体（或分子—微颗粒复合体）进行行波介电电泳来完成这些操纵。另外还使用了包含有 4 个平行、线性的螺旋电极单元的螺旋电极阵列。

图 7 示出了用于传送实体分子（如分子）的电极结构，例如通过对结合体和实体分子复合体（如分子—微颗粒复合体）作行波介电电泳。微颗粒带电荷，这里使用线性电极。

图 8 示出引导并聚集结合体（如微颗粒）和在芯片上实体分子（如分子）于芯片表面的例子，其中

- A) 分子在生物芯片上的溶液中悬浮；
- B) 分子被结合到微颗粒的表面上；
- C) 对生物芯片上电极单元施加电信号，分子—微颗粒复合体被引导（聚集或操纵）到芯片表面上。

图 9 示出了在多项式电极阵列上使用介电电泳来操纵结合体和实体分子复合体（如分子—分子微颗粒复合体）的例子，其中

- A) 分子—微颗粒复合体被操纵到电极单元的中心区域；
- B) 分子—微颗粒复合体被操纵到电极单元的边缘上。

图 10 示出了在交叉城堡式电极阵列上使用介电电泳来操纵结合体和实体分子复合体（如分子—分子微颗粒复合体）的例子，其中

- A) 分子—微颗粒复合体被操纵到电极边缘的内凹区域；
- B) 分子—微颗粒复合体被操纵到电极边缘上。

图 11 描述了对多种不同类型的实体分子混合物（如分子混合物）进行操纵的例子，其中

- A) 分子混合物被放置到一个反应池中，反应池的底部有一个生物芯片；
- B) 用微颗粒从分子混合物中结合/连接/结合目标分子；
- C) 靶分子—微颗粒复合体被吸引到电极平面和电极边缘区域上；
- D) 其他未连接的分子被冲洗掉，而分子—微颗粒复合体被捕获在电极边缘；
- E) 分子从微颗粒的表面上分离或脱离。

图 12 显示了操纵含有不同类型实体分子混合液（如分子混合液）

的例子，其中

- A) 分子混合物被放置到一个反应池中，反应池的底部有一个生物芯片；
- B) 用两种微粒去耦连/连接/结合分子混合液中两种类型的靶分子；
- C) 分子—微粒复合体被吸引到电极平面并处于电极的边缘区域；
- D) 其他未连接的分子被冲洗掉，而分子—微颗粒复合体被捕获在电极边缘；
- E) 通过用不同的电信号选通电极来分离两种类型的分子—微粒复合体。

以下结合附图具体说明本发明。

A. 定义

除非另有定义，所有这里使用的科技术语均指已经具有明确的已被接受了的含义。所有从 GenBank 或其它数据库参考的专利、应用、公开的应用、出版物以及序列等全部加上了参考标记。

例如这里所述的“微流体应用”是指采用微小器件，其基本结构单元的尺寸在亚微米到厘米量级，用于流体操纵、处理及执行特别的生物、生化或化学反应。这些特别的领域包括但不限于生物芯片（如用于与生物相关的反应和操作的微芯片）、化学芯片（用于化学反应的微芯片）或复合芯片。

所述的“实体分子”是指任何需要在芯片上操纵的物质。一般实体分子的尺寸不超过 1cm。更适宜地，实体分子的尺寸小到无法在芯片上被物理力直接操纵。能够用本方法操纵的实体分子包括但不限于细胞、细胞器、病毒、分子（如蛋白质、DNAs、RNAs、聚合体或复合体）。

所述的“植物”指植物界中各种不同的具有光合作用的真核的多

细胞有机体，其典型的特征包括能产生胚芽，具有叶绿体和含纤维素的细胞壁，不具有运动能力。

所述的“动物”指动物界中能运动的，具有非光合作用的新陈代谢，对刺激能响应的，能有限生长且具有确定形体结构的多细胞有机体。动物的例子包括但不局限于鸟（如鸡）、脊椎动物（如鱼）、哺乳动物（如老鼠、兔子、猫、狗、猪、牛、羊，马、猴及其他非人的灵长类动物）。

所述的“细菌”指具有不可划分的环状 DNA 和大约 70S 核糖体的原核有机体（其线性尺寸约为 $1\mu\text{m}$ ）。细菌的蛋白质合成不同于真核生物。许多针对细菌的抗生素能阻碍细菌蛋白质合成，但并不影响细菌的宿主。

所述的“真菌”指除原始细菌外的细菌的一种主要的亚类。大多数革兰氏阳性菌、蓝藻、支原体、肠细菌、假单胞菌和叶绿体都是真菌。真菌的细胞质膜包含酯和脂类的连接体；在细胞壁（如果存在细胞壁的话）中含有肽聚糖；而且真菌中尚未发现有内含子。

所述的“原始细菌”指除原始细菌外的细菌的一种主要的亚类，它主要有三类：嗜盐细菌，甲烷细菌和一种依赖硫生存的极为嗜热的细菌。原始细菌与真菌的区别在于核糖的结构，内含子的含量（在某些例子中）以及包括细胞膜构成在内的其它一些特征。

所述的“病毒”指一种必须寄生于活体细胞内但不是细胞中本来就具有的生物，它由 DNA 或 RNA 和蛋白质外壳构成。病毒的直径从 20nm 左右到 300nm 左右不等。I 类病毒（Baltimore 分类）有一条双链 DNA 作为基因组；II 类病毒有一条单链 DNA 作为基因组；III 类病毒有一条双链 RNA 作为基因组；IV 类病毒有一条正性的单链 RNA 作为基因组，该基因组起着 mRNA 的作用；V 类病毒有一条负性的单链 RNA 作为基因组，被用作 mRNA 合成的模板；VI 类病毒有一条正性的单链 RNA 基因组，但是在复制和 mRNA 的合成时有一条 DNA 作为媒介物。多数病毒以它们在植物体、动物体和原核生物体中引发的疾病来区分。

针对原核生物的病毒即所谓的噬菌体。

所述的“真菌”指真核生物的一种划分，它们无规律地群集生长，没有根、茎、叶，而且缺乏叶绿素或其它可以进行光合作用的色素。每个真菌有机体（菌体）是呈丝状的单细胞，而且具有分支的被细胞壁包围的肉质结构（菌丝），这种细胞壁含有葡聚糖或几丁质或二者兼有，并且含有真正的细胞核。

所述的“结合体”指那些既能以期望的亲合力或特异性地与实体分子绑定在一起，又可以用期望的物理力来操纵。结合体包括但不限于细胞、细胞器、病毒、微粒或它们的聚合物或复合体，还包括分子的聚合物或复合体。

所述的“微粒”指在微流装置或应用中可以被期望的物理力所操纵的具有任意形状、任何组分、任意复杂结构的粒子。更确切地说，本方法使用的微粒具有尺寸从大约 0.01 微米到几千微米，适宜的大小是 0.1 微米到几千微米。微粒的例子包括但不限于塑料颗粒、聚苯乙烯颗粒、玻璃珠体、磁珠、中空玻璃球、金属颗粒或具有复杂的成分或各种微加工出来的结微细构的微粒等等。

所述的“操纵”指对实体分子的移动和处理，这样将导致实体分子在芯片上（不论是在单芯片里还是在芯片组之间或之中）产生一维、二维或三维的运动。操纵的例子包括但不限于输运、聚焦、富集、集中、聚合、捕获、排斥、悬浮、分离、隔离或者实体分子的直线或其它指向的运动。要得到有效的操纵，结合体和本方法中使用的物理力必须协调。例如，具有磁性的结合体必须使用磁场力；类似地，具有确定介电特性的结合体，例如塑料颗粒、聚苯乙烯颗粒，必须使用介电电泳力；带有静电荷的结合体必须使用静电力。

所述的“实体分子不是直接可被一种特定物理作用力操纵”是指当这种特定物理作用力施加到未与结合体结合的实体分子上时，观察不到实体分子的运动。

所述的“芯片”指具有一个或多个一维、二维或三维微结构的固

体基底，在其上可以完成某种过程，比如物理的、化学的、生物的、生物物理的、生物化学的过程等等。本方法中可使用的芯片尺寸的差异相当大，从 1mm^2 左右到 0.25m^2 左右。更确切地说，本方法中使用的芯片尺寸从 4mm^2 左右到 25cm^2 左右，其特征线度从 1mm 到 5cm 。本方法使用的芯片形状亦有相当大的差异，从规则形状如正方形、长方形或圆形到其它不规则的形状。芯片的例子包括但不局限于在玻璃基底上的介电电泳电极（例如：“Dielectrophoretic Manipulation of Particles”，Wang 等，IEEE Transaction on Industry Applications, Vol. 33, No. 3, May/June, 1997, pages 660–669”）和微加工的生物电子芯片上的单点可选通的电极阵列（例如，“Preparation and Hybridization Analysis of DNA/RNA from E. coli on Microfabricated Bioelectronic Chips”，Cheng 等，Nature Biotechnology, Vol. 16, 1998, pages 541–546）以及毛细管电泳芯片（例如，“Combination of Sample-Preconcentration and Capillary Electrophoresis On-Chip”，Lichtenberg 等，Micro Total Analysis Systems 2000, A. van den Berg 等编辑, pages 307–310），和电磁芯片（美国专利申请序列号 09/399, 299, 1999 年 9 月 16 日递交）。

所述的“物理力”指任何能移动结合体—实体分子复合体并同时对结合体和实体分子没有化学或生物作用或是有少量的化学或生物反应，但是这些反应对结合体和实体分子的生物/化学的功能和性质没有影响。

所述的“待操纵的实体分子实质上是结合到结合体的表面上”是指多数待操纵的实体分子被结合到结合体的表面，并且被一种适当的物理力通过操作结合体来操纵它。通常说来，待操纵的实体分子中至少有 5% 被结合到结合体的表面。更确切地说，待操纵的实体分子中至少有 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 或 90% 被结合到结合体的表面。

所述的“待操纵的实体分子被完全结合到结合体的表面上”是指

待操纵的实体分子中至少有 90% 被结合到结合体的表面。更确切地说，待操纵的实体分子中至少有 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99% 或 100% 被结合到结合体的表面。

此处所述的“细胞内实体分子”指任何在细胞内部的实体分子，例如位于细胞质内或细胞器基体上，粘附在细胞内膜上，位于周质内或者位于细胞表面，如粘附在细胞质膜或细胞壁的外表面上。

为了揭示该发明，且使其不被局限，本发明的详细描述分成如下几个子部分。

B. 实体分子

当任意类型的实体分子在芯片上参与了某种确定的过程，如物理的、化学的、生物的、生物物理的或生物化学等等的过程，可以用本方法操纵它们。待操纵的实体分子可以是细胞、细胞器、病毒、分子或者它们的聚合体或复合体。待操纵的实体分子可以是纯净物或混合物，在混合物中，目标实体分子只是其中的一种成分。例如，白血病人血液中的癌细胞，肿瘤病人的病变固态组织中的癌细胞以及怀孕妇女血液中的胎儿细胞都可以成为被操纵的对象。类似地，各种血细胞，如血液中的红细胞和白细胞亦可成为被操纵的对象。DNA 分子、mRNA 分子，确定类型的蛋白分子以及细胞裂解液中的所有蛋白分子都可以是实体分子并被操纵。

可操纵的细胞包括但不限于动物细胞、植物细胞、真菌、细菌、重组细胞或培养细胞。被操纵的动植物细胞，真菌、细菌的细胞可以来自动物、植物、真菌、细菌领域的任何属或亚属。来自于纤毛虫、粘菌、鞭毛虫和微粒子虫的任何属或亚属的细胞亦可成为被操纵对象。鸟类如鸡类，脊椎动物如鱼类，以及哺乳动物如小鼠、大鼠、兔子、猫、狗、猪、母牛、公牛、绵羊、山羊、马、猴及其它人类以外的灵长目动物，以及人类，所有这些动物的细胞都可以被本方法所操纵。

对动物细胞来说，从特定组织到器官的细胞都可成为被操纵对象。例如结缔组织、上皮组织、肌肉组织或神经组织的细胞。类似地，各种器官中的细胞也可被操纵，如眼部附属器官，环形螺旋器官 (annulospiral organ)，耳部器官，契维茨器，室周器官，柯替氏，关键器官，釉质，末梢器官，雌性外生殖器官，雄性外生殖器官，floating organ，flower-spray organ of Ruffini，生殖器官，高尔基氏腱器，味觉器官，听觉器官，雌性内生殖器官，雄性内生殖器官，插入器官，雅各布逊氏器，神经血器官，神经腱梭，嗅觉器官，耳石器，ptotic organ，罗森苗勒器，感觉器官，嗅觉器官，螺旋器，连合下器，穹窿下器官，supernumerary organ，触觉器，靶器官，味觉器官，触觉器官，泌尿器官，vascular organ of lamina terminalis，前庭器官，前庭蜗器，退化器官，视觉器官，梨鼻器，游走器，韦伯器官和主动脉旁体。来自动物内部器官如脑，肺，肝，脾，骨髓，胸腺，心脏，淋巴，血液，骨，软骨，胰腺，肾，胆囊，胃，肠，睾丸，卵巢，子宫，直肠，神经系统，腺体，体内血管等等的细胞更易于操纵。进一步说，来自任何植物、真菌（如酵母菌）、细菌（如真细菌或原始细菌）都可以被操纵。来自任何真核或原核生物的重组细胞，如动物、植物、真菌或细菌的都可以被操纵。来自于身体各部位的体液，如血液、尿液、唾液、骨髓、精液或其它腹水的细胞，以及它们的组分如血清和血浆亦可被操纵。

可操纵的细胞器官包括细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、ERs、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体。可操纵的病毒（无论是完整的病毒还是任何病毒结构）在其生存周期中可以来自诸如 I 类病毒、II 类病毒、III 类病毒、IV 类病毒、V 类病毒或 VI 类病毒。

可操纵的分子可以是无机分子如离子，有机分子或它们的复合体。可操纵的离子的例子包括但不限于钠离子、钾离子、镁离子、钙离子、氯离子、铁离子、铜离子、锌离子、锰离子、钒离子、镍

离子、铬离子、氟离子、硅离子、锡离子、硼离子或砷离子。可操纵的有机分子的例子包括但不局限于氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、碳水化合物、脂类或它们的复合体。

本方法可以操纵任何氨基酸，如 D- 和 L- 氨基酸。此外，天然存在的肽和蛋白质的所有构建成分，包括丙氨酸 (A)，精氨酸 (R)，天冬酰胺 (N)，天冬氨酸 (D)，半胱氨酸 (C)，谷氨酰胺 (Q)，谷氨酸 (E)，甘氨酸 (G)，组氨酸 (H)，异亮氨酸 (I)，亮氨酸 (L)，赖氨酸 (K)，蛋氨酸 (M)，苯丙氨酸 (F)，脯氨酸 (P)，丝氨酸 (S)，苏氨酸 (T)，色氨酸 (W)，酪氨酸 (Y) 和缬氨酸 (V) 都可以被操纵。

本方法可以操纵任何蛋白质和肽。例如，细胞膜上的膜蛋白（如受体蛋白）、酶、运输蛋白（如离子通道和离子泵）、营养或贮藏蛋白、收缩或运动蛋白（如肌动蛋白和肌球蛋白）、结构蛋白、防御蛋白或调节蛋白（如抗体、激素和生长素）。蛋白质的或肽的抗原亦可被操纵。

本方法可以操纵任何核酸，包括单链、双链和三链核酸。这样的核酸的例子包括 DNA（如 A-、B-、Z-型 DNA）和 RNA（如 mRNA、tRNA 和 rRNA）。

本方法可以操纵任何核苷。这样的核苷的例子包括腺嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷、胞嘧啶核苷、胸腺嘧啶核苷、尿嘧啶核苷。本方法亦可操纵任何核苷酸，这样的核苷酸的例子包括 AMP, GMP, CMP, UMP, ADP, GDP, CDP, UDP, ATP, GTP, CTP, UTP, dAMP, dGMP, dCMP, dTMP, dADP, dGDP, dCDP, dTDP, dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP。

本方法可以操纵任何维生素。例如，水溶性维生素如维生素 B₁、维生素 B₂、烟碱酸、维生素 B₃、维生素 B₆、维生素 H、叶酸、维生素 B₁₂ 和维生素 C 可以被操纵。类似地，脂溶性维生素如维生素 A、维生素 D、维生素 E 和维生素 K 亦可被操纵。

本方法可以操纵任何单糖（不管是 D- 还是 L- 单糖，也不管

是醛糖还是酮糖)。单糖的例子包括丙糖(如甘油醛)、四糖(如赤藓糖和苏糖)、戊糖(如核糖, 阿糖, 木糖, 来苏糖和核酮糖)、己糖(如阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖和果糖)以及庚糖(如景天庚酮糖)。

本方法可以操纵任何脂类。脂类的例子包括三酰基甘油(如硬脂酸甘油酯、软脂酸甘油酯和油酸甘油酯)、石蜡、磷酸甘油酯(如磷脂酰乙醇胺、卵磷脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇和双磷脂酰甘油)、鞘酯类(如鞘磷脂、脑苷脂和神经节苷脂)、固醇(如胆固醇和豆甾醇)以及固醇脂肪酸酯。脂肪酸可以是饱和脂肪酸(如十二烷酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸和二十四烷酸), 还可以是非饱和脂肪酸(如棕榈油酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸)。

C. 结合体

任何既能以期望的亲和力和特异性与实体分子结合而且能被适当的物理作用力操纵的结合体都可以在本方法中使用。结合体可以是细胞(如动物、植物、真菌或细菌的细胞); 细胞器官(如细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、粗糙内质网、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体); 病毒, 微粒或者它们的聚合物或复合体。在B部分描述的细胞、细胞器官和病毒亦可被用作结合体。

更确切地说, 本方法使用的微粒, 其线度从0.01微米到几千微米不等。而且, 本方法使用的微粒包括但不局限于塑料颗粒、聚苯乙烯颗粒、玻璃珠体、磁珠、中空玻璃球、金属颗粒或具有复杂的成分或各种微加工出来的结微细构的微粒等等(参见例如: “Design of asynchronous dielectric micromotors” Hagedorn等, *Journal of Electrostatics*, 1994, Volume: 33, Pages 159-185)。具有复杂成分的微粒是指微粒具有多种组成成分, 例如一个金属球体包敷一层非导电的聚合物薄膜。

在选择结合体时，必须根据特殊应用中的操纵方法来确定所用结合体的类型、材料、成分、结构和大小。例如，基于磁场操纵实体分子—结合体复合体就需要用磁珠作结合体；基于介电电泳场操纵实体分子—结合体复合体需要用具有适当介电性质的珠体作结合体。对珠体的选择也跟具体的操纵步骤有关。例如通过介电电泳操纵法从分子和微粒的混合液中分离靶实体分子时，结合体的介电性质应该与那些分子和微粒有显著的差别，这样当结合体和靶实体分子结合后，可以通过介电电泳对实体分子—结合体的复合体进行选择性操纵。在一个从正常细胞混合液中分离目标癌细胞的例子中，癌细胞与正常细胞的介电性质很相近，而且，所有细胞的介电电泳响应也很相似，如都是负向介电电泳。在这个例子中，首选的结合体相对于悬浮介质应该有更强的介电极化性，因此，这类结合体—癌细胞复合体可以通过正向介电电泳力作用而被选择性操纵，相应的其他分子所收的力是负向介电电泳力。通过将表现为正向介电电泳的癌细胞—结合体的复合体收集并捕获到电极边缘，同时通过如流动力之类的力将其他细胞清洗掉的分离方法实现对癌细胞的分离。相似的方法还可以应用在混合液中大部分细胞表现为正向介电电泳时，通过负向介电电泳将靶细胞从细胞混合液中选择性地分离出来。

D. 实体分子和结合体表面的结合和分离

待操纵的实体分子可以使用技术上任何已知的方法结合到结合体的表面。例如，实体分子可以与结合体的表面直接结合或通过连接物（更好的表述是可断裂的连接物）结合。实体分子亦可与结合体的表面通过共价键或非共价键结合。此外，实体分子还可以与结合体的表面通过特异性或非特异性的键合。更确切地说，实体分子和结合体表面的连接是一种可断裂的连接，比如说这种连接可以通过化学、物理或酶的处理断裂开。

连接物可以是任何适合于把实体分子和结合体联系在一起的实体分子。这样的连接物和连接方法包括（但不局限于）氨基酸或肽的连接，典型情况下含有 1 个到 60 个左右的氨基酸，更常见的情况是含有 10 到 30 个氨基酸。化学连接，如异基双功能团可切割连接物，包括（但不局限于）(4-碘代乙酰基)-氨基苯甲酸琥珀酰亚胺酯 (N-succinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoate), (4-碘代乙酰基)-氨基苯甲酸磺化琥珀酰亚胺酯 (sulfosuccinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoate), 4-琥珀酰亚胺基氧代羰基- α - (2-吡啶基二硫代) 甲苯 (4-succinimidyl-oxygen carbonyl- α - (2-pyridyl dithio)toluene), 6- (α -甲基- α - (吡啶基二硫代) -甲苯甲酰基) 己酸磺化琥珀酰亚胺酯 (sulfosuccinimidyl-6- [α -methyl- α - (pyridyl dithiol)-toluamido] hexanoate), 3- (2-吡啶基二硫代) 甲苯甲酰基) -丙酸琥珀酰亚胺酯 (N-succinimidyl-3- (-2-pyridyl dithio) - propionate), 6- (3- (2- (吡啶基二硫代) -丙酰胺) 己酸磺化琥珀酰亚胺酯 (succinimidyl 6[3(-(-2-pyridyl dithio)-propionamido] hexanoate), 6- (3- (2- (吡啶基二硫代) -丙酰胺) 硫代己酸磺化琥珀酰亚胺酯 (sulfosuccinimidyl 6[3(-(-2-pyridyl dithio)-propionamido] hexanoate), 3- (2- (吡啶基二硫代) -丙酰肼 (3- (2-pyridyl dithio)-propionyl hydrazide), 二氯代三牙矽甲酸 (Ellman's reagent, dichlorotriazinic acid) 和 S- (2-硫代吡啶基) -L-巯基丙氨酸 (S-(2-thiopyridyl)-L-cysteine)。其它的连接物包括（但不局限于）肽和其它能减小实体分子和结合体之间的硬脂酸障碍的实体分子，还有光可切割的连接和酸可切割的连接。

其它适合以化学方法连接实体分子和结合体的典型连接物和连接方法包括（但不局限于）二硫键、硫醚键、阻碍二硫键以及自由反应基团，如氨基和硫醇基之间的共价键。通过使用异基双功能团试剂在一条或两条多肽上生成活性硫醇团并让一条多肽上的硫醇团与

其它活性硫醇团或是可以用来连接活性顺丁烯二酰亚胺基团 或硫醇团的氨团反应。其它连接物包括（但不局限于）酸可切割连接物，如 bismaleimideethoxy propane, acid labile-transferrin conjugates 和 adipic acid dihydrazide, 可以在多个酸性的细胞内区域被切割；紫外或可见光可切割连接物，当它们暴露在紫外光或可见光下(比如各种 domains C_H1、C_H2 和 C_H3)时会从人免疫球蛋白 G1 的固定区域断裂 (Batra 等, Molecular Immunol., 30:379-386 ((1993))。在一些具体的实例中，几种连接物可以同时使用以充分发挥各自的优势。

酸可切割连接物、光可切割连接物和热敏连接物也可使用，尤其在操纵后需要把实体分子从结合体上断开的场合。酸可切割连接物包括（但不局限于）bismaleimideethoxy propane、adipic acid dihydrazide 连接物 (Fattom 等, Infection & Immun., 60:584-589 (1992)) 以及酸易变铁传递蛋白结合足够数量的铁传递蛋白进入细胞内铁传递蛋白循环路径 (Welhöner 等, J. Biol. Chem., 266:4309-4314 (1991))。

光可切割连接物指那些一旦暴露在光下就发生断裂的连接物（参见，Goldmacher 等, Bioconj. Chem., 3:104-107 (1992)), 因而把实体分子释放出来。这样的光可切割连接物的例子包括针对巯基丙氨酸的光切割保护基团硝基苄基基团 (Hazum 等, Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 16th, Brunfeldt, K (Ed), pp. 105-110 (1981)), 水溶性光切割共聚物，包括羟丙基甲基丙烯酰胺共聚物 (hydroxypropylmethacrylamide copolymer), 氨基乙酸共聚物，荧光素共聚物和甲基罗丹明共聚物 (methylrhodamine copolymer) (Yen 等, Makromol. Chem, 190:69-82 ((1989)), 一个能承受接近紫外光 (350nm) 的光连接物和试剂(Goldmacher et al., Bioconj. Chem., 3:104-107 ((1992)) 以及用 nitrobenzyloxycarbonyl chloride cross linking reagents 制作的光可切割连接臂 (Senter 等, Photochem.

Photobiol., 42:231-237 (1985)。 31

其它连接物包括三苯甲基连接物，尤其是衍生的三苯甲游基基团，它可以生成一个互补基因以在各种酸碱度下使实体分子分离开（美国专 5,612,474 号）。附加的连接性实体分子在下列地方有描述，如 Huston 等， Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883 (1988), Whitlow 等， Protein Engineering, 6:989-995 (1993), Newton 等, Biochemistry, 35:545-553 (1996), Cumber 等, Bioconj. Chem., 3:397-401 (1992), Ladurner 等, J. Mol. Biol., 273:330-337 (1997) 及美国专利 4,894,443 号。在某些情形下，几种连接物可以同时使用以发挥它们各自的优势。

本方法中首选的连接方式是通过生物素-链亲合素相互作用、抗原-抗体相互作用、配体-受体相互作用或核酸互补序列杂交来实现的。

化学连接物和肽连接物可以通过共价键合插入到实体分子和结合体之间。通过表达 DNA 编码，让肽连接物和肽实体分子形成融合蛋白而使肽连接物连接到一个肽实体分子上。通过表达 DNA 编码，也可以让肽连接物和肽结合体形成融合蛋白而使肽连接物连接到一个肽结合体上。

下面的描述阐明了作为待操纵实体分子的分子是如何结合到作为结合体 s 的微粒上的。在一个例子中，根据分子的性质和微粒表面的组分，分子有可能被动地被吸引到微粒表面。这种吸引可能是针对特定类型的分子，如蛋白质分子对核酸分子，也可能是不针对特定的分子组成和结构。蛋白质分子可以被动地被聚苯乙烯颗粒吸引。这种被动式地吸引蛋白质分子通常是稳定的。DNA 分子在高盐环境里可以被束缚在玻璃珠体的表面。诸如疏水相互作用和离子电解相关的静电相互作用都可能参与被动吸引过程。

在另一个例子中，分子可以被特异地束缚在微粒的表面。这种特异性的束缚和结合可以包括待操纵分子和微粒表面分子的共价或非

共价的相互作用。例如，蛋白质分子可以被共价地吸附到聚苯乙烯颗粒的表面，依靠的是二亚胺碳与具羧酸酯功能团的珠体或戊二醛与氨基珠体的作用。再例如经链亲合素修饰的珠体，它可以通过生物素-链亲合素相互作用与生物素化的分子结合。

再举一个例子，具有特异性连接能力的分子可以用来把待操纵的分子与微粒表面结合起来。可以利用链亲合素和生物素分子间的高度亲合束缚力。具体连接方法的如下所述。链亲合素分子首先附着或连接到微粒表面以便使所有的微粒都预先覆盖一层链亲合素分子。待操纵的分子再连接到生物素分子上。分子结合到微粒表面的步骤包括了生物素（连接到待操纵分子）和链亲合素分子（连接到待操纵微粒）之间的相互作用。此外，在这样的应用中最好使用可切割的连接分子。因此，如果需要的话，操纵结束后连接分子可以断开以便分子从微粒表面分离开。

下面的描述阐明了三类生物分子（DNA，mRNA 和蛋白质分子）与微粒表面的结合。DNA 分子可以以特异性方式或非特异性方式结合到微粒表面。对非特异性方式的结合，可以使用多孔珠体（如玻璃微粒）或具有甲硅烷氧基的微粒。在适宜的缓冲环境下（如高盐条件），DNA 可以被吸引到珠体上。当把珠体置于低盐或无盐的缓冲液中时，DNA 分子与珠体的结合可以容易地分开。因此，采用简单地减少缓冲液盐浓度的方法，就可以把 DNA 释放出来以做进一步的分析。DNA 与珠体的特异性结合可以通过序列特异性杂交来实现，例如单链 DNA 的杂交捕获，DNA 三重结构和抗 DNA 抗体结合。

为了捕获 mRNA 分子，微粒表面要经过修饰，即附着上聚胸腺嘧啶。在适宜的调节下，样品中 mRNA 分子的 poly-A 尾部将特异地结合到微粒表面的 poly-T 上。通过改变微粒悬浮液的温度，mRNA 分子可以容易地从微粒上分离出来以便做进一步的生物分析。对特异性的 mRNA 分离，可以使用互补的寡核苷酸 cDNA 连接到微粒上同时与目标 mRNA 分子杂交。mRNA 从微粒上的分离可以通过变性的方法实现。

蛋白质可以特异性或非特异性的与微颗粒结合。通过使用洗涤剂分子对微颗粒表面进行化学修饰，可以使蛋白质分子与微颗粒非特异性结合。例如 SDS，因为众所周知蛋白质分子可以与 SDS 非特异性结合。这样，在微粒表面结合 SDS，就何以使蛋白质分子结合到微粒表面。而对于特异性捕捉蛋白质分子，可以在微颗粒表面结合抗体。

在某些情况下，把实体分子-结合体复合体（如分子-微颗粒）操纵到特定位置后，微颗粒不干扰分子所参与的反应。这样，就没有必要从微颗粒表面分离分子。而在其它情况下，必须或者最好在操纵步骤后进行分离。分离步骤的性质决定与实体分子、结合体表面修饰以及操纵步骤的性质。一般来说，分离的条件是和二者结合的条件相反的。例如，实体分子和结合体在高盐浓度下结合，那么在低盐浓度下可以使二者分离。同理，如果实体分子与结合体是通过特定的连接或连接臂结合在一起，那么，把复合体置于能切割连接臂的条件或试剂中，就可以把实体分子和结合体分离。

下列描述显示了几种分子从微颗粒表面分离的过程。如果分子是特异性或者非特异性的吸附在微颗粒表面，在适当的物理化学条件下，分子可以脱离微粒表面。例如，在高盐浓度下，DNA 分子吸附在玻璃表面。如果降低盐（电解质）浓度，DNA 分子又重新溶解到溶液中。在适当的条件下，可以破坏分子与微颗粒之间共价键或非共价键连接。例如，在特定的 pH 值和特定的电解质浓度下，抗原和抗体结合。改变 pH 值和电解质浓度到一定值，就可以把抗原和抗体分离。如果分子和微颗粒表面是通过连接分子连接的，最好是把连接分子切除。这样，在操纵完分子-微颗粒复合体后，切割连接分子，就可以把分子从微颗粒表面分离出来。

E. 物理力

任何物理力都可以应用到目前的方法中。其中包括介电电泳力、行波介电电泳力、电磁力（比如通过铁磁材料或者微电磁单元激发

磁场而产生的效应)、声波力(比如由驻波场、行波场产生的效应)、静电力(比如由直流电场产生的效应),机械力(比如流体运动产生的力),以及光辐射产生的力(比如由光钳产生的光强场激发的效应)等等。

介电电泳指得是极性颗粒,在非均匀交流电场中的运动。当把一个颗粒放置在一个电场中,如果该颗粒的介电性质与其周围介质的介电性质不同,这个颗粒就会产生介电极化。这样就会在颗粒/介质表面诱导出电荷。如果施加的电场是非均匀性的,那么非均匀电场与诱导出的极化电荷相互作用产生的净力将作用在颗粒上,使其朝电场强或弱的方向运动。作用在颗粒上的净力叫做介电力,颗粒的运动叫做介电电泳。颗粒的介电性质、颗粒周围介质的性质、施加电场的频率以及电场分布决定了介电力的大小和方向。

行波介电电泳与介电电泳类似:行波电场与电场诱导电荷相作用,电场力左右在颗粒上。颗粒在顺着或逆着行波场的方向上运动。颗粒的介电性质、颗粒周围介质的性质、行波电场的频率和大小决定了行波介电力的大小和方向。介电电泳和行波介电电泳理论以及介电电泳在操纵、处理微颗粒上的应用可以在很多文献中找到(“Non-uniform Spatial Distributions of Both the Magnitude and Phase of AC Electric Fields determine Dielectrophoretic Forces”, Wang 等, *Biochim Biophys Acta* Vol. 1243, 1995, pages 185–194, “Dielectrophoretic Manipulation of Particles”, Wang 等, IEEE Transaction on Industry Applications, Vol. 33, No. 3, May/June, 1997, pages 660–669, “Electrokinetic behavior of colloidal particles in traveling electric fields: studies using yeast cells”, Huang 等, J. Phys. D: Appl. Phys., Vol. 26, pages 1528–1535, “Positioning and manipulation of cells and microparticles using miniaturized electric field traps and traveling waves”, Fuhr 等, Sensors and Materials. Vol. 7: pages

131-146, "Dielectrophoretic manipulation of cells using spiral electrodes", Wang, X-B. 等, *Biophys. J.* Volume 72, pages 1887-1899, 1997, "Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity", Becker 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol., 92, January 1995, pages 860-864)。通过介电电泳和行波介电电泳对微颗粒的操作包括富集、捕捉、排斥、线性或者其它方向的运动、悬浮以及不同颗粒的分离。颗粒可以被聚焦、富集以及捕捉到电极反应池的特定区域。在微观上，颗粒可以分为不同的种类。颗粒可以被运送特定的距离。对于特定颗粒的操纵所必须的电场分布，可以通过介电电泳理论和电场模拟方法得出。

半径为 r ，处于非均匀电场的颗粒所受到的介电力 F_{DEP_z} 可以通过以下方程得出： $F_{DEP_z} = 2\pi\epsilon_m r^3 \chi_{DEP} \nabla E_{rms}^2 \cdot \vec{a}_z$

其中 E_{rms} 是场强的均方根值， ϵ_m 是介质的介电常数， χ_{DEP} 是颗粒的极化系数，即：

$$\chi_{DEP} = \operatorname{Re} \left(\frac{\dot{\epsilon_p} - \dot{\epsilon_m}}{\dot{\epsilon_p} + 2\dot{\epsilon_m}} \right)$$

其中 Re 指的是复数的实部。标号 $\dot{\epsilon_x} = \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{2\pi f}$ 是复合介电常数(对于颗粒 $x=p$ ，对于介质 $x=m$)。参数 ϵ_p 和 σ_p 分别是有效介电常数和颗粒的电导率。这些参数都与频率有关。例如，至少是由于细胞质膜的极化，一个细胞的有效电导率和介电常数将受频率影响。

上述关于介电力的方程也可以写作：

$$F_{DEP_z} = 2\pi\epsilon_m r^3 \chi_{DEP} V^2 p(z) \vec{a}_z$$

其中 $p(z)$ 是施加在电极上的单位电压激励 ($V=1V$) 的方形电场分布。 V 是施加的电压。

一般的有两种介电电泳，正向介电电泳和负向介电电泳。在正向

介电电泳中，微粒受介电电泳力作用被推到电场强的区域。而在负向介电电泳中，微粒受到负向介电电泳力的作用被推到电场弱的区域。微粒表现为正向或负向介电电泳是由微粒相对于周围介质的极化度决定的。

行波介电电泳力指行波场施加在微粒或分子上的力。一个行波电场是一个交流电场具有非均匀的相位分布。

这里我们分析一个理想的行波场产生的行波介电电泳力。行波电场 $E_{TWD} = E \cos(2\pi(f t - z/\lambda_0)) \hat{a}_z$ 作用在半径为 r 的微粒上的介电泳力 F_{DEP} 为：

$$F_{TWD} = -2\pi\epsilon_m r^3 \zeta_{TWD} E^2 \cdot \vec{a}_z$$

其中 E 是场强， ϵ_m 是介质的介电系数， ζ_{TWD} 是微粒的极化系数，由下式给出：

$$\zeta_{TWD} = \text{Im} \left(\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right)$$

“Im”指复数的虚部， $\epsilon_x^* = \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{2\pi f}$ 是复合电容率（对微粒 $x=p$ ，对介质 $x=m$ ）。参数 ϵ_p 和 σ_p 依次是微粒的有效电容率和电导率，这些参数都是与频率相关的。

诸如细胞之类的微粒具有不同的介电特性（由电容率和电导率来定义），它们将表现出不同的介电电泳力。对于行波介电电泳操纵微粒（包括生物细胞）的例子，作用在直径 10 微米微粒上的行波介电电泳力其大小介于 0.01 到 10000 pN。

通过对芯片上的微电极施加适当的交流信号，可以产生一个行波电场。为了产生一个行波电场，最少需要三路具有不同相位的电信号。例如可施加 4 路不同相位的电信号（0, 90, 180 和 270 度）在芯片表面四个线形的平行电极上以产生行波电场。这种 4 个电极形成了一个基本的重复单元。依据不同的需要可以有两个或多个这类单元依次排布形成电极阵列。这样在电极附近的空间将产生一个行波电场。随着电极单元在空间的延伸，施加序列相位的电信号将在

电极周围区域产生一个行波电场。

颗粒也可以通过施加磁力来操纵。磁场力指磁场施加在微粒上的力。通常，微粒应该是磁性的或顺磁性的并且需要有足够的磁力才能操纵微粒。我们考虑一种由超顺磁性材料制作的磁微粒。当微粒受磁场 \bar{B} 作用时，在微粒上将诱导出一个磁偶极子 $\bar{\mu}$

$$\bar{\mu} = V_p (\chi_p - \chi_m) \frac{\bar{B}}{\mu_m},$$

$$= V_p (\chi_p - \chi_m) \bar{H}_m$$

其中 V_p 时微粒的体积， χ_p 和 χ_m 是微粒和周围介质的磁化系数， μ_m 介质的磁导率， \bar{H}_m 是磁场强度，作用在微粒上的磁场力 $\bar{F}_{magnetic}$ 由磁偶极矩和磁场梯度决定：

$$\bar{F}_{magnetic} = -0.5 V_p (\chi_p - \chi_m) \bar{H}_m \bullet \nabla \bar{B}_m$$

其中符号“•”和“ ∇ ”依次指点乘和梯度运算。明显地，作用在微粒上的磁力与微粒和介质的磁化系数差由很大的关系。典型地，微粒悬浮在非磁性的液体中（其磁化系数近似为零）因此需要用磁微粒（其磁化系数远大于零）。微粒在磁力和液体粘附力的共同作用下其运动速度为：

$$v_{particle} = \frac{\bar{F}_{magnetic}}{6\pi r \eta_m}$$

其中 r 是微粒的半径， η_m 是周围介质的粘质系数，因此为了获得足够大的磁操纵力，必须考虑下列因素：(1) 磁微粒的磁化系数必须足够大；(2) 磁场强度必须很大；(3) 磁场强度的梯度必须很大。

顺磁性颗粒最受青睐。即在外界磁场作用下诱导出磁偶极子，当撤掉外加磁场后，磁偶极子变为 0。对于这方面的应用，可以使用市场上可得到的顺磁或者其它磁性颗粒。这些颗粒的大小在几个（例如 50nm-0.5 微米）到几十微米之间。它们结构和组成不同。一种磁珠是铁磁材料包裹在薄乳胶内，例如聚苯乙烯，外壳。另一种磁珠是纳米级的铁磁颗粒扩散并和乳胶层混合在一起，例如聚苯乙烯，包被。这两种磁珠的外层都是聚苯乙烯，通过对聚苯乙烯进行修饰可以与多种分子相连接。

对磁珠的操纵需要在微观范围内有磁场分布。一种产生这样磁场分布的方法是利用微电磁单元。在施加电流的情况下，这些单元可以被激发或者产生磁场。施加电流的通断状态以及大小决定了磁场的分布。可以根据所需要的磁场分布来设计微电磁单元的结构和大小。对磁珠的操纵包括定向移动、磁珠的聚焦和捕捉。磁珠在磁场中的运动叫做“磁泳”。磁泳的理论及其用于细胞分离和其它用途可参考下列文献：“Magnetic Microspheres in Cell Separation”，Kronick, P. L. in Methods of Cell Separation, Volume 3, edited by N. Catsimpoolas, 1980, pages 115-139; “Use of magnetic techniques for the isolation of cells”, Safarik I. 及 Safarikova M., J. of Chromatography, 1999, Volume 722(B), pages 33-53; “A fully integrated micromachined magnetic particle separator”, Ahn C. H. 等, J. of Microelectromechanical systems, 1996, Volume 5, pages 151-157。

微颗粒也可以通过施加声波力来操纵。例如通过利用声场。在一种情况下，通过叠加一个声源产生的声波以及它的反射波，可以产生一个驻波声场。颗粒在驻波场内经受所谓的声波辐射力。声波辐射力决定于颗粒的声波阻抗以及它们周围的介质特性。声波阻抗是材料密度以及声波在材料中传播速度影响的产物。如果颗粒的声波阻抗比它周围介质的声波阻抗大，它将运动到驻波场的压力接点处。在不同的声波场分布中，颗粒经受不同的声波力。

产生声源的一种方法是利用压电材料。通过施加适当频率的电场，这些材料产生机械震动，并且传导到材料周围的介质中去。其中一种压电材料是压电陶瓷。可以在压电陶瓷表面加工上微电极，激发压电陶瓷产生适当的声场。根据不同的应用需要，可以设计不同大小和几何形状的微电极。为了产生驻波声场，反射壁是必须的。可以应用不同频率的声波场，例如频率从几千赫兹到几百兆赫兹变化。在另一个方案中，使用非驻波声场，如行波声波，颗粒不但直

接受到声波力，而且由于流体在行波场的作用下产生运动，颗粒还受到周围流体发出的力。利用声场，可以在微流体环境中对颗粒进行聚焦、富集、捕捉、悬浮以及运输。

通过对压电传感器施加交流信号，可以产生超声平面驻波。例如驻波在液体空间中 z 轴的变化可以通过以下方程来表达：

$$\Delta p(z) = p_0 \sin(kz) \cos(\omega t)$$

其中 Δp 是 z 轴的声压， p_0 是声压的大小， k 是波数 ($2\pi/\lambda$ ，其中 λ 是波长)， z 是从波节开始后的距离， ω 是角频率，以及 t 代表时间。根据 Yoshioka 和 Kawashima 在 1955 年提出的理论（见“Acoustic radiation pressure on a compressible sphere”，K. Yoshioka 及 Y. Kawashima, Acustica, 1955, Vol. 5, pages 167–173），在静态驻波场中，作用在一个圆形颗粒的发射力 $F_{acoustic}$ 可以通过一下方程得出（见“Studies on particle separation by acoustic radiation force and electrostatic force”，Yasuda K. 等, Jpn. J. Appl. Physics, 1996, Volume 35, pages 3295–3299）：

$$F_{acoustic} = -\frac{4\pi}{3} r^3 k E_{acoustic} A \sin(2kz)$$

其中 r 是颗粒的半径， $E_{acoustic}$ 是平均声场能量密度， A 是一个常数，即：

$$A = \frac{5\rho_p - 2\rho_m}{2\rho_p + \rho_m} - \frac{\gamma_p}{\gamma_m}$$

其中 ρ_m 和 ρ_p 分别是颗粒和介质的密度， γ_m 和 γ_p 分别是颗粒和介质的压缩率。 A 在这里是声波极性系数。

当 $A > 0$ 时，颗粒朝驻波的节电处 ($z=0$) 运动。

当 $A < 0$ 时，颗粒背离驻波的节电处 ($z=0$) 运动。

很明显，当许多颗粒被放置在同一个驻波场中时，拥有不同密度和压缩率的颗粒将受到不同的声波辐射力。例如，在已有的声波能量密度分布中，作用在一个直径是 10 微米的颗粒上的声波发射力颗

粒在 0.01—1000pN 之间变化。

在外界机械力作用下发生形变，那么由压电材料制成的压电传感器可以产生电场（压电效应）。相反，外界施加电场也可以对材料产生机械应力（电致收缩效应）。这造成了能量在机械和电场之间的转换。压电效应由 Pierre Curie 和他的兄弟 Jacques 在 1880 年发现的。这是由于离子的取代导致了材料结构单元的电极化。当外界施加电场，离子被静电力所取代，导致了整个材料的机械变形。

微颗粒也可以通过施加直流电场来操纵。直流电场对带电颗粒施加静电力。静电力决定于颗粒的电荷强度、极性以及电场的强度和方向。带正电和负电的颗粒将分别运动到负电位和正电位的电极。通过在一个微流体装置中设计微电极阵列，可以构造和实现适当的电场分布。利用直流电场，可以在微流体装置中对颗粒实现富集、聚焦以及运输。为了避免和防止不希望出现的表面电化学反应以及保护电极，在直流电极表面使用适当的介电外壳。

在外界电场 $E_z \bar{a}_z$ 中对颗粒施加的电场力 F_E 可以通过以下得出：

$$F_E = Q_p E_z \bar{a}_z$$

其中 Q_p 是颗粒上的有效电荷。静电力的方向决定于颗粒电荷的极性以及外界电场的方向。

同时也可以施加其它物理力。例如，机械力，其中流体流动产生的力可以用来运送微颗粒。在光钳使用的光辐射力可以用来聚焦、富集、悬浮以及操纵微颗粒。光辐射力是所谓的梯度力即当一个具有与周围介质不同折射系数的物质（如微颗粒）处于光梯度中产生的。当光通过极化物质时，它诱导产生了变化的偶极子，这些偶极子电磁场梯度相互作用，如果物质的折射系数大于周围介质的折射系数，它将受到一个指向光亮区域的力；相反地，如果物质的折射系数小于周围介质的折射系数，它将受到一个指向光暗区域的力。光钳的理论及其用途可参考下列文献（“Making light work with optical tweezers”，Block S. M., Nature, 1992, Volume 360, pages

493-496; “Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime”, Ashkin, A., Biophys. J., 1992, Volume 61, pages 569-582” ; “Laser trapping in cell biology”, Wright 等, IEEE J. of Quantum Electronics, 1990, Volume 26, pages 2148-2157; “Laser manipulation of atoms and particles”, Chu S., Science, 1991, Volume 253, pages 861-866)。

F. 芯片内部和外部的芯片和结构

目前的各种方法都可以用到芯片上。例如，这些方法可以用于由硅、氧化硅、氮化硅、塑料、玻璃、陶瓷、光刻胶和橡胶芯片上。另外，这些方法可以用在化学芯片上，即芯片可以进行化学反应。也可以用在生物芯片上，即芯片可以进行生物反应。或者二者的混合物生物化学芯片。

通过在芯片外部的结果以及构建在芯片内部的结构，可以产生在目前方法中使用的各种力。外部结构是能量源与内部结构相连并激发内部结构产生物理力，诸如介电力、磁力、声波力、静电力、静电力、机械力和光发射力。芯片内部的结构有一个或多个微单元组成。当每个微单元被激化并且与外部结构相结合，何以在结合体上施加各种物理力。在多单元的例子中，内部结构还包括用于实现单点可选通的方法。

在一个例子中，电磁力被用来操纵一个实体分子（如 DNA 分子）和结合体（如表面经过修饰用于结合 DNA 分子的磁珠）。这个电磁芯片公布在相应的美国专利申请序列号 09/399, 299 中，该申请于 1999 年 9 月 16 日递交。此专利申请及其它的相关内容都可以用在这些方法中。每个拥有单点可选通单元的电磁芯片由以下组成：一个基底；在基底上的一组微电磁单元，每个单元在外加电场作用下可以诱导出磁场；单点可选通的方法。而且在电磁芯片表面附着一层功能层以用来固定特定类型的分子。在用磁力操纵实体分子-结合体复合体

的例子中，微电磁单元是构建在芯片上并且与微电磁单元相连的电流源是在芯片外面。当外部电流源施加信号在微电磁单元上，在微电磁单元附近将产生一个磁场并且将有磁力施加在处于微电磁单元附近的磁颗粒上。

在另一个例子中，当使用介电电泳力和行波介电电泳力操纵实体分子（如蛋白分子）和结合体（如表面经修饰可以结合蛋白分子的聚苯乙烯颗粒）的复合体，可以结合玻璃芯片上螺旋形的电极阵列和外部的序列相位交流信号源达到操纵的目的（见“*Dielectrophoretic manipulation of cells using spiral electrodes*”，Wang, X-B. 等, *Biophys. J.* Volume 72, pages 1887–1899, 1997）。在这个用介电电泳操纵实体分子-结合体复合体的例子中，螺旋电极阵列构建在芯片上，与之相连的交流信号源在芯片外。当外部交流信号源对螺旋电极阵列施加合适相位的信号时，在螺旋电极阵列周围区域将产生电场，有该电场将对该区域内的实体分子-结合体复合体产生介电电泳力和行波介电电泳力。

在另一个例子中，当使用声波场操纵实体分子（如细胞）和结合体（如表面经修饰可以结合蛋白分子的聚苯乙烯颗粒）的复合体，可使用如 Oeftering, R. 在美国专利 6,029,518 号中所述的相位阵列压电传感器。在这个用声波场操纵实体分子-结合体复合体的例子中，相位阵列压电传感器构建在芯片上，与之相连的交流信号源在芯片外。当外部交流信号源对相位阵列压电传感器施加合适的信号时，压电传感器将产生声波并传递到压电传感器周围的区域。依靠包括压电传感器在内的流体池结构，当实体分子和实体分子-结合体复合体的悬浮液被导入到流体池内，实体分子和实体分子-结合体将受到声波辐射力。

G. 当前方法的应用例子

在此展现的各种方法可以普遍应用到微流体装置和系统中，例如

43

微机构装置，装置的每个基本结构的特征大小在小于 1 微米到厘米之间，主要是用来进行流体操纵和处理，特定生物、生化或者化学反应。特定应用领域包括，但不局限于，生物芯片，即与生物反应和处理有关的微芯片；化学芯片，即与化学反应有关的微芯片；或者是二者的组合物。例如，一个理想的基于生物芯片的分析仪器包括以下步骤：血细胞的处理和分离，靶细胞的胞解以及 mRNA 的萃取，mRNA 的运输，反转录，PCR 扩增以及最后靶 DNA 分子的检测。这个仪器包括一系列基于生物芯片的，互相连接的反应腔。在一个芯片中处理的分子需要被运输到下一个芯片。对靶分子的控制、处理、操纵以及定向转运只是这些应用中的一个基本步骤。通过在结合体 s 表面结合分子，所述方法可以在这类基于生物芯片的多个内部相连的反应池内进行多重生物处理步骤。例如，在适当的物理力作用下（如介电电泳力），一种珠体可以作为结合体用于从血液中分离目标细胞。当从血细胞复合体中分离出目标细胞-结合体的复合体后，细胞被胞解；进一步用做结合体以结合细胞的珠体被移走，第二类针对胞解产物中 mRNA 分子的结合体（一个不同类型的珠体）被导入并与 mRNA 分子结合形成 mRNA-结合体复合体；mRNA-结合体复合体将被操纵并转运到另一个用于进行反转录的反应池。

在此展现的各种方法可以用于任一种操纵。操纵例子包括但不限于运输、聚焦、富集、集合、捕捉、排斥、悬浮、分离以及线性或者其它方向的运动。下列描述显示目前方法的应用。第一个例子与在生物芯片上分离靶分子有关。步骤包括：(1) 含有两种或者多于两种分子的混合物被导入到一个基于生物芯片的反应池，在分子混合物中，有一种靶分子。(2) 加入可以和靶分子结合的微珠（结合体 s）进反应池。(3) 培养混有微珠的分子混合物，以使得微珠可以和靶分子结合。如果有必要，需要在特定温度和机制下进行微珠和分子的混合。(4) 利用一定的物理力收集微珠。如果微珠是顺磁性的，通过选通制作在生物芯片上的微电磁阵列，使微珠感应出磁

UF

性，这样微珠就被捕捉到微电磁单元上。（5）微反应池内引入外界流体，借助流体运动产生的力，把缓冲液冲走，而微磁珠仍然被抓在微电磁单元。（6）通过可选通的关掉微电磁单元，就可以把微珠从微电磁单元上释放出来。之后，可选择性的把靶分子从微颗粒表面分离出来，以供下面应用。

第二个例子与在生物芯片上运输靶分子特定距离有关。这个例子的步骤除了以下操纵步骤（4）外，与前一个例子相似。即物理力是用来运输微颗粒。物理力用来运输的例子包括行波介电电泳、电泳和介电电泳。还有，在这个例子中，（5）和（6）步骤没有必要。第三个例子与在生物芯片上聚焦靶分子在特定位置有关。这个例子的步骤除了以下操纵步骤（4）外，与前一个例子相似。即物理力使用来把微颗粒运输和聚焦到特定区域。物理力用来这类运输的例子包括介电电泳、磁泳、行波介电电泳。当微颗粒被聚焦在特定区域后，把靶分子从微颗粒表面分离出来，以供下面应用。

通过利用目前的方法，可以实现各种各样的操纵，诸如悬浮、捕捉、运输、旋转以及线性运输。例如介电电泳力(Wang 等, *Biochim. Biophys. Acta.* 1243:185~194 (1995)), 几种电极结构用于产生能激发介电电泳力和行波介电电泳力的电场(例如, Wang等, *IEEE Trans. Ind. Appl.* 33:660~669 (1997))。在以下文献中可以看到目前方法在操纵中的应用, Wang 等, *Biophys. J.* 72:1887~1899 (1997) (利用螺旋电极实现富集、分离操纵); Wang 等, *Biophys. J.* 74:2689~2701 (1998), Huang 等, *Biophys. J.* 73:1118~1129 (1997), 及 Yang 等, *Anal. Chem.* 71(5):911~918 (1999) (利用介电场流分离法实现从电极中悬浮、排斥和分离操纵); Gascoyne 等, *IEEE Trans. Ind. Apps.* 33(3):670~678 (1997), Becker 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:860~864 (1995) 及 Becker 等, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 27:2659~2662 (1994) (颗粒的捕捉、排斥以及重新分配和分离, 以及通过介电电泳迁移进行分离和通过介电电泳滞留

进行分离); Huang 等, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 26:1528~1535 (1993) (通过行波介电电泳实现排斥、输运和捕捉); and Wang, et al., *J. Phys. D: Appl. Phys.* 26:1278~1285 (1993) (捕捉、分离和排斥)。在这些参考文献中操纵的目标对象是生物微粒如细胞和表面涂覆的珠体。操纵的步骤和装置可以用于操纵发明中所述的结合体、实体分子-结合体复合体

其他在文献中报道操纵的例子可以采用所述的方法操纵实体分子, 最好是用介电电泳力, 可以实现操纵的例子还有: 从血细胞中分离细菌以及分离不同的微生物(Hawkes 等, *Microbios.* 73:81~86 (1993); 及 Cheng 等, *Nat. Biotech.* 16:547~546 (1998)); 从血细胞中富集 CD34+ 干细胞(Stephens 等, *Bone Marrow Transplantation* 18:777~782 (1996)); 利用介电电泳力收集病毒颗粒、微米以下微珠以及生物分子(Washizu 等, *IEEE Trans. Ind. Appl.* 30:835~843 (1994); Green 及 Morgan, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 30:L41-L44 (1997); Hughes 等, *Biochim. Biophys. Acta.* 1425:119~126 (1998); 及 Morgan 等, *Biophys J.* 77:516~525 (1999)); 利用介电电泳力抬升细胞以研究细胞特性(Fuhr 等, *Biochim. Biophys. Acta.* 1108:215~233 (1992)); 单一颗粒的均一性操纵(Washizu 等, *IEEE Trans. Ind. Appl.* 26:352~358 (1990); Fiedler 等, *Anal. Chem.* 70:1909~1915 (1998); 及 Mü ller 等, *Biosensors and Bioelectronics* 14:247~256 (1999)); 介电电泳场阱(Schnelle 等, *Biochim. Biophys. Acta.* 1157:127~140 (1993); Fiedler 等, (1995); Fuhr 等, (1995a); Fiedler 等, (1998); Mü ller 等, (1999)); 利用线性电极阵列对细胞进行行波介电电泳操纵(Hagedorn 等, *Electrophoresis* 13:49~54 (1992); Fuhr 等, *Sensors and Actuators A*: 41:230~239 (1994); 及 Morgan 等, *J. Micromech. Microeng.* 7:65~70 (1997))。

下面是进一步对核酸分子和血细胞进行操纵的例子;

1. 分离 mRNA 分子

使用一个底部有一块芯片的流体池。在芯片上加工有微电极阵列。微电极阵列上的每个单元可以通过开关的方法控制芯片与外部信号源之间的通断。进一步可以通过外部信号来调节磁场强度的大小。使用顺磁性磁珠（如 0.5-5 微米），polyT (T-T-T-T...) 分子通过共价连接在磁珠表面。将珠体放入 mRNA 分子溶液（如细胞裂解液或组织裂解液）中一起培养，在成熟 mRNA 的 3' 末端存在的 poly A 将与顺磁性磁珠表面的 polyT 分子形成碱基对。将培养液导入微流体池中，培养过程将在微流体池中完成。通过对芯片表面的微电极施加电信号，在芯片表面的特定位置将产生磁场，磁珠颗粒朝芯片上这些特定位置聚集或移动或聚焦（如浓缩或运输磁颗粒）。这样 mRNA 就被浓缩到这些区域上。保持磁场的作用，用缓冲液冲洗，这样只有磁颗粒和它们所附带的 mRNA 被留在芯片表面，而其它的分子都被冲洗掉。通过使用 DEPCV 处理过的水可以将 mRNA 从微颗粒表面释放下来以供进一步的反应（如 RT-PCR，体外反转录等等）。

2. 分离 DNA 分子

该例子与上面所述的例子（1）很相似。这里，磁微粒表面修饰有羧基。在培养过程中，溶液中的 DNA 分子在高浓度的盐和聚乙烯乙二醇的条件下非特异性地结合在顺磁性磁珠的表面。一旦被束缚，DNA 是稳定的，只有在不同的低盐浓度缓冲液（如 Tris）才会从磁珠表面脱离。可以采用与上面相似的处理步骤，通过对芯片表面的微电磁单元施加电信号，可以将磁颗粒导引，浓缩并聚集在目标区域。

3. 运输 mRNA 或 DNA 分子

构建与上面例子中相似的流体池。在流体池底部的芯片具有一个电极阵列，通过对电极阵列施加一定相位的信号可以输运颗粒。在流体池中产生一个行波电场，当导入微粒后，将有行波介电泳力产生并移动和输运微粒。在 mRNA（或 DNA）分子结合在微颗粒的表面

上后，分子-微颗粒复合体将被输运到芯片表面特定的区域，由此 mRNA 或 DNA 也得到了输运。

上面的例子利用的是微粒因为这些微粒所具有的介电性质使它们可以通过行波介电电泳达到操纵的目的。如果声波力和磁力也具有类似的操纵能力，那么也可以对其他的微粒进行操纵。

4. 从人的全血中分离白细胞

4. 1. 目标白细胞连接或结合在磁珠表面

我们利用该发明中所述的方法完成了从人全血中分离白细胞的实验。使用的顺磁性磁珠是 Dynal 公司的（4.5 微米的 M-450 珠体），顺磁性磁珠表面修饰了 CD15 或 CD45 抗体，用于结合 CD15 和 CD45 阳性的人白细胞。首先，各取 12.5 微升的来自 Dynal 公司的 CD15 和 CD45 磁珠悬浮液（内含 5×10^6 个磁珠）混合在一起，用 PBS（磷酸盐缓冲液）冲洗 3 次。取冲洗好的珠体与 100 微升人全血在 Eppendorf 管中混合。在 4°C 条件下培养并轻微摇晃 10 分钟。让白细胞结合在顺磁性磁珠表面。特别地，一个白细胞将与一个或多个磁珠结合（）。

4. 2. 将磁珠与血液的混合液导入流体池中，该流体池包括底部的一个电磁芯片：

一个塑料的环行垫片粘在电磁芯片表面。该环行垫片的中间是一个圆形的中空洞，由它构成了流体池的主体。电磁芯片具有微加工形成的电磁单元，该单元具有一个磁芯和一个线圈。当对线圈施加 400 微安培的电流时，在磁单元的周围将诱导出磁场。白细胞/顺磁性磁珠的复合体被吸引到磁场最强的区域。施加电流几分钟之后，所有的磁珠和白细胞/磁珠复合体都被吸引到磁单元区域。用流体冲去剩余的红细胞和没被吸引的磁珠。这样通过这些处理白细胞/磁珠复合体被留在流体池中。依据不同的用途，可有多种方法用于从磁珠表面分离白细胞。

H. 不同的操纵方法、试剂盒及其使用

本发明所描述的操纵方法可以有很大的不同而且可以有很多适当的用途如分离、制备、检测、诊断、预后、监测和筛选等等。

在一个特殊的实体例子中，被操纵的实体分子是细胞而且该细胞特异地结合在一个表面修饰有抗细胞的特殊抗体的结合体（如磁珠）表面。这样，通过使用带有必须的特殊抗体的结合体就可以操纵任意的靶细胞。

在其他的特殊实体例子中，被操纵的实体分子是充分地结合在结合体表面以增大操纵的效率。最好是被操纵的实体分子完全结合在结合体的表面。例如，如果 mRNA 是被操纵的实体分子，mRNA 分子就应充分地结合在结合体（如微粒）上。在具体的应用 mRNA 分子结合在微粒上的百分率可能不同。例如，在一些应用中如果 5% 的 mRNA 分子量对后续的操纵和检测是足够的话，那么“充分结合在结合体上的 mRNA 分子”就指 5% 的 mRNA 分子被结合在结合体上。在其他的应用中，“充分地结合在结合体上”也可能是 80% 左右的 mRNA 分子结合在结合体上。如果结合体是微粒，那么“充分地结合在结合体上”的 mRNA 分子应该是结合在一个微粒上，或是结合在多个微粒上。最好是即便没有必要让 mRNA 分子结合在一个或一类微粒上，这些 mRNA 分子也应该全部结合在微粒上。

虽然所描述的方法可以用于一次操纵一个实体分子，但是因为这些方法可以很容易地改成自动操纵，所以这些方法也可以用于同时/顺序操纵多数实体分子。通过一个或多个结合体可以操纵多个实体分子，比较好的是通过相应的多个结合体操纵多个实体分子。

当同时操纵多个实体分子时，此处所述的方法就可以用于大规模检测、监测或筛选，如筛选药物或其他需要的生物活性物质。例如，在药物筛选和开发中，操纵方法可以用于监测和检测靶细胞的响应，再根据基因表达图和蛋白表达及定位图确定筛选候选药物。在这些操作中，通过此处所述方法利用第一类结合体（如可以特定识别和

结合靶细胞的磁珠)先对靶细胞进行操纵和分离,然后,再用这些操纵方法对来自于分离后靶细胞中的 mRNA 分子进行操纵和/或分离。这里对靶细胞的处理包括从靶细胞中获得 mRNA 分子和蛋白分子。具体是对靶细胞进行胞解,胞解产物中含有多种来自于细胞的生物分子如蛋白、RNA、DNA、脂类等等。然后用针对于靶蛋白的第二类结合体和针对于 mRNA 的第三类结合体来选择性操纵蛋白和 mRNA。例如这两类结合体都是介电微粒但是具有不同的介电性质,这样一类将表现正向介电电泳而另一类在相同条件下将表现负向介电电泳。通过适当的介电操纵方法(在 G 部分中所描述的方法),在这两类结合体与对应的蛋白和 mRNA 分子结合后,可用于分离和选择性操纵这些靶样品。对选择性操纵的 mRNA 和蛋白可以作进一步的分析检测以获得如数量和活性等参数。通过比较候选药物处理过与没处理过细胞的 mRNA 和/或蛋白的表达图谱可以确定该候选药物的效用。

本发明中的方法还可以用于从靶细胞中分离一个细胞内实体分子,具体步骤如下: a) 来自于生物样品中的靶细胞结合在第一类结合体表面形成靶细胞一结合体复合体; b) 利用芯片上的物理力分离靶细胞一结合体复合体,分离效果是通过与芯片结合在一起的外部结构或是构建在芯片上的结构来产生的; c) 从分离处的靶细胞处获得细胞内实体分子; d) 分离出的细胞内实体分子与第二类结合体结合形成细胞内实体分子一结合体复合体; e) 利用芯片上的物理力分离细胞内实体分子一结合体复合体,分离效果是通过与芯片结合在一起的外部结构或是构建在芯片上的结构来产生的。分离出来的细胞内实体分子可以用于进一步的检测、分析和反应。

细胞内实体分子可以从任意的靶细胞中分离出。最好的是细胞内的实体分子可以从来自生物样品的任意靶细胞中分离出来。此处靶细胞包括但不局限于动物细胞、植物细胞、真菌、细菌、重组细胞或培养细胞、或来自于部分组织和器官的细胞。最好生物样品是流体如血液、唾液、骨髓、精液或其他腹水流体包括如血清和血浆等。

其他的非流体生物样品如来自于固体组织或器官的样品也可以应用本发明中的方法。这些方法更适于预后、诊断、药物筛选和开发等应用，并且靶细胞可以是生理正常或不正常的细胞如来自于确定疾病、失调或感染病人的细胞或细胞用候选药物处理过。

任何所要的细胞内实体分子都可以从靶细胞内分离出来。例如，可以分离细胞器、分子或它们的聚合体或复合体。细胞器包括但不限于细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、ERs、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体，分子包括无机分子如离子、有机分子或复合体。离子包括但不限于钠、钾、镁、钙、氯、铁、铜、锌、锰、钴、碘、钼、钒、镍、铬、氟、硅、锡、硼或砷离子，有机分子包括但不限于氨基酸、肽、蛋白质、核苷、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖，碳水化合物、脂类、酶如激酶、激素、受体、抗原、抗体、包括有一个信号传导的分子或其他复合体。

可以通过已知的方法从靶细胞一结合体复合体中获取细胞内实体分子。在一些例子中，可以对靶细胞进行胞解以获得细胞内实体分子。然而，在其他一些例子中，靶细胞具有足够的渗透性，细胞内实体分子可以穿透细胞膜和/或细胞壁，这样就不必对细胞进行胞解。例如，如果所要的细胞内实体分子处于植物或细菌细胞的周质中，这些细胞内实体分子可以通过去处细胞壁同时保持细胞质膜不受损害来获得。相似的，如果所要的细胞内实体分子位于细胞质内，通过打破细胞质膜而又不触及细胞器和其他结构的方法获得。同样还有其他合适的方法可以采用。

方法还包括其他的步骤如分离、传输和/或检测等步骤。在一个具体的实体例子中，方法还进一步包括在从分离后的靶细胞内获得细胞内实体分子前将第一类结合体从靶细胞一结合体复合体上分离开。

在一个具体的实体例子中，方法进一步包括传输获得的细胞内实体分子到一个新的场所以利于结合第二类结合体的步骤，或者是传

输细胞内实体分子一结合体复合体到一个新的场所以便于分离细胞内实体分子一结合体复合体。

在一个具体的实体例子中，方法进一步包括检测分离后的细胞内实体分子一结合体复合体或传输分离后的细胞内实体分子一结合体复合体到一个新的场所以便于检测细胞内实体分子一结合体复合体的步骤，具体的检测可以是检测、监测、诊断、预后或其他的目的，并且这些分析可以是定性的或定量的。根据细胞内实体分子种类的不同，可以在芯片上或芯片外用多种不同的方法来分析。检测的方法，量化的方法或分析细胞内实体分子活性的方法对细胞生物学、分子生物学和免疫学的专业人士是很清楚的。例如，通过将 mRNA 反转录成 cDNA，再经过 cDNA 扩增、杂交检测可以用于感兴趣的细胞内实体分子是 mRNA 的情况。如果感兴趣的细胞内实体分子是酶，那么不同的酶检测方法可以用于对细胞内实体分子进行酶活检测。

在其他的具体实体例子中，操纵的方法进一步还包括将细胞内实体分子从细胞内实体分子一结合体的复合体上分离开以及对分离后细胞内实体分子进行检测的步骤；或者是将分离后的细胞内实体分子传输到一个新的场所以便于对细胞内实体分子进行检测（如检测、监测、诊断、预后或其他适当的目的，这些分析可以是定量或定性的）的步骤。

这里所介绍的方法一般包括两个步骤，分离靶细胞和对分离后的靶细胞进行处理以便于进行其他分析。这两个步骤都可以通过本发明所介绍的方法来实现。在芯片上通过使用结合体可以实现对靶细胞的分离并操纵靶细胞一结合体复合体。对分离后的靶细胞的进一步处理步骤也包括在芯片上使用结合体以及操纵样品。当然，这两种步骤都可以通过本发明中的方法来实现。在一些实体例子中，分离后的靶细胞可以被分析（如进行检测、监测或筛选）。对细胞的分析可以采用细胞生物学中的通用方法在芯片外进行，例如通过对细胞进行确定的荧光标记后进行荧光主动细胞分类分析（fluorescent-

52

activated-cell-sorting)。对细胞的分析也可以在芯片上进行，可以是与分离细胞同一块生物芯片的不同部位，也可以是与分离细胞芯片集成在一起另一块生物芯片。用生物芯片分析细胞可以通过不同特点的方法实现，例如具有介电电泳特性的电旋转方法可以用于测量细胞的介电性质。对经确定荧光抗体标记的细胞可以通过荧光分析或检测。那些精于电旋转、电化学检测和介电阻抗检测的人士可以设计合适的芯片结构以及实验方法用于这些细胞的分析。在其它的实体例子中，确定的细胞内实体分子可以从分离后的靶细胞中分离出并对其做进一步分析。例如，DNA 可以被分离出并进一步做杂交、测序、突变或多态分析如单核苷多态性分析 (SNP)。mRNA 可以被分离并进行基因表达。样品中分离的 DNA 或 mRNA 可以用本发明中介绍的方法做进一步分析 (可参见 G 部分介绍)。对分离后的 DNA 分子的进一步分析 (如杂交、测序、突变或多态分析如单核苷多态性分析 (SNP)) 或分离后 mRNA 分子的分析 (如杂交、反转录成 cDNA 并进行扩增和检测/定量检测) 可以在芯片上或芯片外进行。在实验室可以用通常的分子生物学技术进行 DNA 和 mRNA 分子的芯片外分析。那些精于分子生物学的专业人士可以选择合适的分析方法。不同的基于生物芯片的方法可以用于检测和分析 DNA 和 RNA，例如用于分离分子的毛细管电泳和电渗，电致杂交和在 DNA 阵列上杂交。蛋白可以分离并进行蛋白组学研究如确定级别、翻译后修饰修饰 (post-translational modification)、细胞内定位和功能分析。分离蛋白分子可以采用本发明中的方法 (参见 G 部分的例子)。如同分离 DNA 和 RNA 分子，分离蛋白分子也可以在芯片上或芯片外通过分子生物学、免疫学和蛋白分析方法来实现。其它的小生物分子 (如激素、激酶、酶和多糖) 也可以被分离并分析。分离这些小分子可以采用本发明介绍的方法并通过使用结合体以及生物芯片上所产生的操纵力来实现。分离的生物分子可以在芯片上或芯片外通过分子生物学、蛋白检测和其它的生化检测方法做进一步分析。操纵、分离和分析

这些分离后的目标细胞或细胞内实体分子可以是定性的或定量的。虽然对一个靶细胞或一个细胞内实体分子进行操纵、分离和分析是可行的，但是最好是对多个靶细胞或细胞内实体分子进行分析。例如，多个靶细胞或细胞内实体分子，在结构上相连的如从同一个组织或器官上分离出来的，功能上有相关性如参与同一个生物途径，或两者都有例如处于同一个发育水平的可以被本发明所介绍的方法操纵、分离和分析。在操纵多个来自于分离后靶细胞的细胞内实体分子时，可以使用多个结合体，每种结合体对应结合一类细胞内实体分子。例如，磁珠可以用于结合 mRNA，同时，表面修饰的聚苯乙烯珠体、玻璃珠、确定类型的金属珠体可以用做结合体结合 DNA、蛋白和生物小分子。这些不同的结合体可以在芯片上被选择操纵，这样，mRNA、DNA、蛋白和生物小分子可以被分别操纵并分析。

在一个具体的实体例子中，本发明所介绍的方法直接针对在微流体应用中产生 cDNA 文库，该方法包括：a) 将待分离的靶细胞结合在第一类结合体表面形成靶细胞—结合体复合体；b) 通过芯片上产生的物理力分离靶分子—结合体复合体，其中所述的分离效果是通过结合在芯片上的一个外部结构或是构建在芯片上的结构来实现的；c) 对分离的靶细胞进行胞解；d) 将第一类结合体从胞解的靶细胞上分离开并去除；e) 在细胞裂解液中将待分离的 mRNA 结合到第二类结合体的表面形成 mRNA—结合体复合体；f) 通过芯片上产生的物理力分离 mRNA—结合体复合体，其中所述的分离效果是通过结合在芯片上的一个外部结构或是构建在芯片上的结构来实现的；g) 将分离后的 mRNA—结合体复合体传输到另一个反应池中并对 mRNA 作反转录形成 cDNA 文库。靶细胞可以来自不同的样品如血液样品或从其他体液中培养的细胞样品。

在另一个具体的例子中，发明直接针对在微流体应用中用于确定靶细胞内基因表达的方法，该方法包括：a) 将待分离的靶细胞结合在第一类结合体表面形成靶细胞—结合体复合体；b) 通过芯片上产

生的物理力分离靶分子—结合体复合体，其中所述的分离效果是通过结合在芯片上的一个外部结构或是构建在芯片上的结构来实现的；c) 对分离的靶细胞进行胞解；d) 将第一类结合体从胞解的靶细胞上分离开并去除；e) 在细胞裂解液中将待分离的 mRNA 结合到第二类结合体的表面形成 mRNA—结合体复合体；f) 通过芯片上产生的物理力分离 mRNA—结合体复合体，其中所述的分离效果是通过结合在芯片上的一个外部结构或是构建在芯片上的结构来实现的；g) 确定分离出 mRNA 分子的数量。对 mRNA 的定量分析可以通过不同的分子生物学方法来实现。例如 mRNA 可以先反转录成 cDNA，然后将放在 DNA 微阵列上杂交以确定 cDNA 的数量。靶细胞可以从不同的样品中获取，如被药物分子或候选药物分子处理过的细胞。

在其他的例子中，本发明还包括在微流体应用中用于操纵实体分子的一个试剂盒，该试剂盒包括：a) 一个结合体，被操纵的实体分子可以结合在该结合体表面形成实体分子—结合体复合体；b) 用于将实体分子结合到结合体表面的方法；c) 一块芯片，通过结合在芯片上的一个外部结构或是构建在芯片上的结构可以产生物理力用于操纵实体分子—结合体复合体。最好该试剂盒能进一步包括实体分子结合在结合体表面以及在芯片上操纵实体分子—结合体复合体的使用说明书。其他适当的方法如从结合体表面分离实体分子，检测或监测操纵的实体分子，传输操纵的实体分子到一个新的场所以及收集操纵的实体分子等方法都可以包括在这个试剂盒中。

I. 对该方法和装置图例的详细描述

图 1 是在芯片上操纵微颗粒上结合分子的示意图。这是一个生物芯片 10 的截面图，在它的上面放置着包含带操纵分子 20 的悬浮液。该芯片表面加工有一个平行线电极阵列 30。平行线电极阵列是一个线形的直线性电极阵列，每一个电极都与其它电极平行并且间隔地连接在一起。对电极的具体描述可以参考“Dielectrophoretic

Manipulation of Particles", Wang 等, IEEE Transaction on Industry Applications, Vol. 33, No. 3, May/June, 1997, pages 660-669。芯片的基底材料可以是硅, 玻璃, 塑料, 陶瓷或其它固体基底。基底可以是致密的或非致密的材料。通过光刻方法在基底材料上加工电极, 电极是有薄的金属层或其它导电材料层构成。一个电极构成的例子是 1000 埃的金层覆盖在 70 埃的铬上, 详见“Dielectrophoretic Manipulation of Particles”, Wang 等, IEEE Transaction on Industry Applications, Vol. 33, No. 3, May/June, 1997, pages 660-669。任何熟悉微加工的人员均可容易地决定或选择或开发适宜的加工步骤和材料用于加工所需的不同形状和尺寸的电极。

图 1(A) 是溶液中的分子 20 放置于芯片 10 的表面的示意图。图 1(B) 是分子 20 结合或连接在微颗粒 50 的表面形成分子-微颗粒复合体 60 的示意图。通过不同的机制可以将分子连接或结合在微颗粒的表面。例如, 对于待操纵的蛋白分子, 与这些蛋白相对应的抗体事先被结合在微颗粒的表面, 这样, 将蛋白结合在微颗粒表面可以通过抗体-蛋白结合来实现。图 1(C) 显示了从信号源 70 给电极阵列 30 施加适合的电信号, 在电极阵列的周围形成不均匀的电场, 由此产生介电泳力施加于微粒-分子复合体并将其抬升到电极平面上的一定高度。在这个例子中, 操纵指将分子抬升到离流体池底部一定高度处。电信号的波形、频率、大小和其他性质可以根据微粒-分子复合体的介电性和物理性质来决定。相关的介电电泳理论可以参考 “Dielectrophoretic Manipulation of Particles”, Wang 等, IEEE Transaction on Industry Applications, Vol. 33, No. 3, May/June, 1997, pages 660-669” 和 “Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow-fractionation”, Huang 等, Biophysical Journal, Volume 73, August 1997, page 1118-1129。任何熟悉介电电泳技术和介电电泳抬升微粒技术的人员均可以容易地选择或决定用于介电电泳抬升的适宜的电信号。

为了实现图 1 所示的操纵方法，必须构建一个流体池。图 2 是这类流体池的一个示意图。在流体池的底部有一个生物芯片 10，一个环行垫片 80 用于句顶流体池的高度，一个上盖片 90，流体进口 100 和出口 110 加工在盖片 90 上。这三部分结合在一起形成流体池。为了示意方便，这三部分并没有画在一起。生物芯片 10 表面集成着平行电极。为了示意目的，这些电极和图 1 中的电极相似。特别地，为了操纵微粒，这些电极宽度和间距在 1 微米到 5000 微米之间，比较适宜的尺寸是 10 微米到 200 微米。需要说明的是，在这里，电极并没有按比例绘制。这些平行线电极可以用于多种不同的操纵如抬升，捕获，固定或分离。在这类例子中，利用了基于不均匀电场的介电泳力施加在微粒上。

进一步对图 1 和 2 中的电极，可以采用其它的几何形状，例如交错式/对式城堡电极，多项式电极（详见“Dielectrophoretic Manipulation of Particles”，Wang 等，IEEE Transaction on Industry Applications, Vol. 33, No. 3, May/June, 1997, pages 660-669），交错式/对式半圆形电极（详见“Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity”，Becker 等，Proc. Natl. Acad. Sci., Vol., 92, January 1995, pages 860-864），和其它形状的电极（详“Selective dielectrophoretic confinement of bioparticles in potential energy wells”，Wang 等，J. Phys. D: Appl. Phys., Volume 26, pages 1278-1285）。图 3(A) 和 3(B) 显示了两种不同形状的交错式电极，如图 3 (A) 半圆形边缘的电极 120 和图 3 (B) 中三角形边缘的电极 130。通过光刻技术可以容易地在基底材料上加工这些电极。

图 4 式用声场力操纵流体池中分子和分子-微粒复合体的示意图。流体池的底部有一块压电陶瓷 140，环行垫片 150 决定的流体池的高度，上面是一块声波反射片 160。在操作中，垫片与压电陶瓷结合在一起。包含分子的液体样品被导入到环行垫片的中空部分。从

信号源 70 对压电陶瓷 140 施加信号，由压电陶瓷 140 产生的声波将被发射/传递/结合在液体中。声波传递到上盖片后部分被反射回液体中。在压电陶瓷的表面波将沿着相似的“运动”和“反射”路径运动。这些发射和反射的声波在流体池中相互叠加，形成驻波分量和行波分量。这样的声波将对微粒和分子产生作用力。例如，辐射力可以对悬浮于液体中的微粒作用并依据微粒相对于微粒悬浮介质的声波性质让微粒处于驻波声压力的波节或波腹处。因为分子的尺寸很小，所以通常施加在分子上的声波辐射力也很小。因此，分子一般先结合在声波可操纵的微粒的表面。例如，直接用驻波操纵分子很困难，但是，选择一种具有合适声学性质的微粒，分子可以间接的被传输或聚集到驻波场中声压力的波节或波腹处。利用驻波场对微粒进行操纵的例子可以参考很多文献，如“Ultrasonic manipulation of particles and cells”, Coakley 等, *Bioseparation*. 1994. 4: 73-83; “Particle column formation in a stationary ultrasonic field”, Whitworth 等, *J. Acoust. Soc. Am.* 1992. 91: 79-85; “Manipulation of particles in an acoustic field”, Schram, C. J. In *Advances in Sonochemistry*; Mason, T. J., Ed.; JAI Press Ltd, London, 1991; Vol. 2: pp293-322; “Enhanced sedimentation of mammalian cells following acoustic aggregation”, Kilburn 等, *Biotechnol. Bioeng.* 1989. 34: pp 559-562。

图 5 是利用行波介电泳传输分子-微粒复合体的示意图。图 5(A) 和 5(B) 分别是线形电极阵列的俯视图和截面图。线形电极单元 170 与一个 4 相位信号源 190 通过焊盘 180 相连并保证每间隔 3 个电极的信号是相同的。4 个相位信号分别为 0, 90, 180 和 270 度，依次施加在电极上，由此在电极单元 170 上方产生一个行波电场。分子-微粒复合体 60 在这样一个行波电场中所受的介电力 F_{200} 的方向与行波场的方向相同或相反。截面图 5(C) 显示了分子-微粒复合体 60 被

传输到电极阵列的末端。通过使用行波介电泳，在生物芯片上的分子在不同电极阵列的控制下可以以任意方向或任意路径传输。进一步，通常的步骤包括将分子结合到微粒表面，将分子-微粒复合体输运到所需位置，然后将分子从微粒上分离开。这里列出一些介绍行波介电泳操纵微粒的理论的参考文献，“Dielectrophoretic Manipulation of Particles”，Wang 等，IEEE Transaction on Industry Applications，Vol. 33，No. 3，May/June，1997，pages 660–669；“Electrokinetic behavior of colloidal particles in traveling electric fields: studies using yeast cells”，Huang 等，J. Phys. D: Appl. Phys.，Vol. 26，pages 1528–1535；“Positioning and manipulation of cells and microparticles using miniaturized electric field traps and traveling waves”，Fuhr 等，Sensors and Materials. Vol. 7: pages 131–146；“Non-uniform Spatial Distributions of Both the Magnitude and Phase of AC Electric Fields determine Dielectrophoretic Forces”，Wang 等，*Biochim Biophys Acta* Vol. 1243，1995，pages 185–194。

图 6 通过行波介电泳在螺旋电极阵列 210 上聚集，输运，分离和导引分子-微粒复合体的示意图。在该例子中，螺旋电极阵列包括 4 个平行的，同心的，线形的螺旋电极。通过外部信号源 190 产生 0, 90, 180, 270 度的 4 个相位信号顺序激发螺旋电极，在施加这样的电信号后，在电极阵列的上方将产生一个不均匀的行波电场。分子-微粒复合体 60 被导入到这样的电场中并受到介电泳力的作用，该介电泳力有一个垂直于电极平面和一个平行于电极平面的分量，平行分量 220 主要产生行波介电泳并导引分子-微粒复合体 60 向螺旋电极阵列中心移动或者是朝相反的方向移动，复合体运动的方向取决于微粒的介电性质和所施加电信号的顺序。这里列出一些介绍螺旋电极阵列操纵理论和操纵微粒的方法的参考文献，“Dielectrophoretic manipulation of cells using spiral

electrodes", Wang, X-B. 等, *Biophys. J.* Volume 72, "pages 1887-1899, 1997. 因此, 通过让靶分子与微粒结合的方法, 应用螺旋电极阵列可以从分子混合体系中聚集或分离出靶分子并使之聚集于电极阵列的中心, 在运输/操纵微粒到电极阵列中心后, 可以将靶分子从微粒上分离出来。

图 7 是通过平行线电极利用行波电泳输运分子-微粒复合体的示意图。在这个例子中, 微粒是带电的, 通过直流电场产生电泳力来操纵微粒。图 7 中, 微粒带正电, 因此直流电场将推动微粒到负极上。图 7(A) 显示了一个输运中的中间状态, 只有一个电极是负极, 分子-微粒复合体 60 被捕获在这个电极上, 其它的电极都是正极并对微粒产生排斥力。在图 7(B) 中, 具有负电势的电信号被替换到下一个电极, 同时将其它电极的电势都改为正电势, 这样, 分子-微粒复合体被导引并控制在当前具有负电势的电极上。在图 7(C) 中, 负电势信号又替换到下一个电极, 同样, 分子-微粒复合体也转移到下一个电极。在这样一个输运方式下, 分子-微粒复合体的运动与施加在电极上的负电势信号同步。因为分子-微粒复合体的运动是依靠电泳而我们是顺序施加电信号并导引出的电场, 所以称这种现象为行波电泳。对熟悉电泳的人来说, 可以轻易地修改现有的方案以实现同样的行波电泳。例如, 如果我们选择带负电的微粒, 就需要用带正电势的电信号驱动和输运微粒。利用这种简单的原理, 通过设计合适的电极阵列并施加一定的电信号可以在生物芯片上实现对不同类型分子和微粒的控制和输运。

图 8(A) 到 8(C) 是通过介电电泳在芯片表面导引并输运分子的示意图。在生物芯片的表面集成了平行电极阵列 30。图 8(A) 显示了被导引到芯片表面的分子悬浮溶液。图 8(B) 显示了分子被结合/连接在微粒的表面形分子-微粒复合体 60。图 8(C) 显示了从信号源 70 施加合适频率的信号以后, 分子-微粒复合体被聚集或操纵或带到芯片表面。分子可以进一步从微粒表面分离开以供后面生化反应(如与

事先固定在芯片表面的分子反应等) 使用。在这里采用的流体池与图 2 中的流体池很相似。在这里用于导引/操纵微粒到芯片表面的平行电极的详细介绍可参见 “Dielectrophoretic Manipulation of Particles”, Wang 等, IEEE Transaction on Industry Applications, Vol. 33, No. 3, May/June, 1997, pages 660-669。

图 9 是使用多项式电极阵列 240 操纵分子-微粒复合体的示意图。多项式电极阵列的几何形状和操作原理可参见“Electrode design for negative dielectrophoresis”, Huang 及 Pethig, *Meas. Sci. Technol.* Volume 2, 1991, pages 1142-1146。图 9(A) 显示了通过信号源 70 对四个电极单元 270 施加电信号后, 分子-微粒复合体 60 被聚集在 4 个电极所包围的中心区域。图 9(B) 显示了分子-微粒复合体 60 被导引/操纵到多项式电极的边缘。多项式电极还可以进一步用于分离不同类型的微粒或分子-微粒复合体。利用多项式电极分离微粒的例子参见 “Selective dielectrophoretic confinement of bioparticles in potential energy wells”, Wang 等, *J. Phys D: Appl Phys.* Volume 26, 1993, pages 1278-1285。

图 10 是使用交错式城堡电极阵列 250 操纵分子-微粒复合体的示意图。图 10(A) 显示了通过信号源 70 施加适当的信号, 分子-微粒复合体受到正向介电泳力并被导引和捕获在电极 250 的边缘。图 10(B) 显示了分子-微粒复合体受到负向介电泳力的作用, 被导引并聚集在两个相临电极头的中间区域。图 10 中的交错式电极阵列与下面参考文献中所述的电极相似, “Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated microelectrodes”, Pethig 等, *J. Phys. D: Appl Phys.*, Volume 25, 1992, pages 881-888。利用这种电极操纵分子或分子-微粒复合体的进一步使用的例子可以参考文章 “Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated

microelectrodes", Pethig 等, *J. Phys. D: Appl Phys.*, Volume 25, 1992, pages 881-888 和 "Selective dielectrophoretic confinement of bioparticles in potential energy wells", Wang 等, *J. Phys D: Appl Phys.* Volume 26, 1993, pages 1278-1285。进一步, 在图 3(A) 和 3(B) 中描述的电极阵列同样可以采用相似的操纵方式。

图 11 是表面集成有微电极阵列 30 的生物芯片从分子混合体系中操纵和分离靶分子的示意图。这里电极和流体池与图 1 和 2 中描述的很相似。图 11(A) 显示了包括靶分子 20 的分子混合体系被导引到底部有一块生物芯片的流体池内。图 11(B) 显示了微颗粒 50 与分子混合体系中的靶分子 20 结合/连接/结合形成分子-微粒复合体 60。图 11(C) 显示了通过信号源 70 对电极 30 施加适当的电信号, 分子-微粒复合体 60 被吸引到电极平面并被捕获。当分子-微粒复合体被施加在其上的介电电泳力捕获在电极平面上后, 施加其他的力如流体流动产生的机械力使其它分子被冲出流体池。图 11(D) 显示在其它不需要的分子被冲洗后, 分子-微粒复合体依然留在电极边缘。图 11(E) 显示靶分子从微粒表面分离下来。通过这些步骤, 其它分子都被冲洗掉, 只有靶分子可以被保留在流体池中。通过其它方法, 可以将微粒从流体池中移开, 靶分子可以参与进一步的生化反应。

图 12 显示了利用表面集成微电极 30 的生物芯片来操纵和分离来自于细胞混合液的两类靶分子(如 Mrnafenzi 和确定的蛋白分子)。此处所用的电极形状以及流体池与图 5 和 2 中的很相似。此处所用的电极结构可以产生介电电泳力和行波介电电泳力作用于微粒。图 12 (A) 显示包含靶分子 20 和 25 的分子混合液被导入到包括底部有生物芯片 10 的反应腔中。图 12 (B) 显示使用两类用于结合、连接来自于分子混合液中的靶分子 20 和 25 的结合体与靶分子结合形成分子-微粒复合体 60 和 65。图 12 (C) 显示施加来自于信号源 70 的适当信号于电极 30, 用于吸引分子-微粒复合体 60 和 65 到电极平面并捕获它们。在通过施加在分子-微粒复合体上的介电电泳力作用后,

62

分子—微粒复合体被捕获到电极平面，施加其它力如流体力将非靶分子冲洗出反应腔。图 12 (D) 显示在冲洗掉不需要的细胞后，细胞—微粒复合体被保留在电极边缘。图 12 (E) 显示在不同条件下施加行波介电泳力让两类靶分子—微粒复合体的运动方向相反，并将其分离。不同条件是指用于产生行波电场的不同的场频率，不同的强度，不同的激发信号模式。通过这个步骤，只有两类靶分子被保留在反应腔中，其他的分子都被去掉，进一步，两类分子被电极分开。根据不同的应用，微粒可被去处用操纵出反应腔。靶分子即可进行进一步的生化反应。对于图 12 中所示的例子，两种微粒的介电性质需仔细选择，这样，在第一次施加电场下两种微粒都显示正向介电泳如图 12C 所示，而在第二次施加电场时，两种微粒将表现出不同方向的行波介电泳方向。那些精于介电泳和行波介电泳的人可以通过微粒的大小、成分和几何形状确定具有合适性质的微粒。那些精于介电泳和行波介电泳的人可以采用不同的介电泳操纵方法以获得如图 12 中所示的效果，即从分子混合液中分离两类靶分子。

除上面所介绍的微粒或分子的操纵方法外，还有很多其它的在芯片上操纵微粒的方法和方案。例如，利用三维电极形成的介电场阱可以捕获，定位，处理和操纵分子和分子-微粒复合体。下面所列的参考文献给出了电极结构和对微粒的操纵均适用于分子-微粒复合体。“Three-dimensional electric field traps for manipulation of cells – calculation and experimental verification”， Schnelle T. 等， *Biochim. Biophys. Acta.* Volume 1157, 1993, pages 127-140; “A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles”， Mü ller, T. 等， *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 14, pages 247-256, 1999; “Dielectrophoretic field cages: technique for cell, virus and macromolecule handling”， Fuhr, G. 等， *Cellular Engineering*.

63

Autumn: pages 47-57, 1995; "Electrocasting - formation and structuring of suspended microbodies using A.C. generated field cages", Fiedler S. 等, *Microsystem Technologies*. Volume 2: pages 1-7, 1995; "Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem", Fiedler, S., *Anal. Chem.* Volume 70: pages 1909-1915, 1998.

上面所述的例子只是用于说明解释该发明，并不表示该发明只局限于所述的这几种方案。对该领域熟悉的人可以很容易地对装置进行修改以达到新的使用目的，所以，该发明所覆盖的范围以权利要求书中所述为标准。

说 明 书 附 图

64

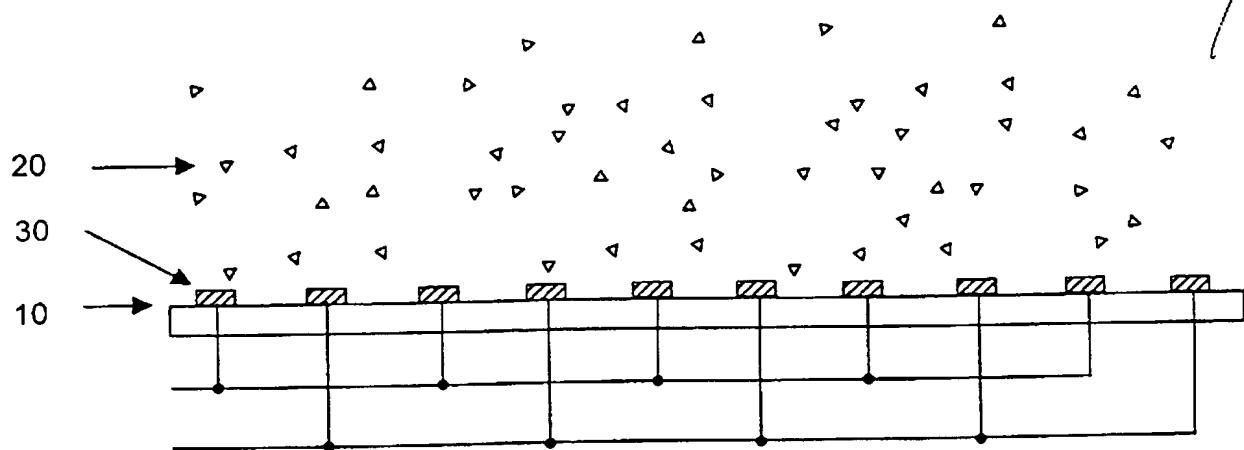


图 1 (A)

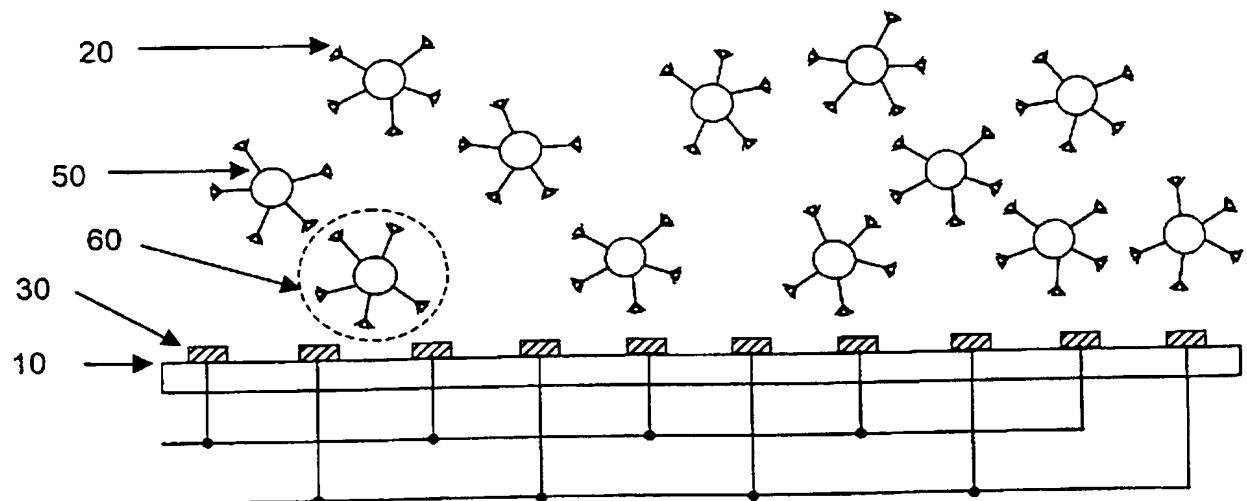


图 1 (B)

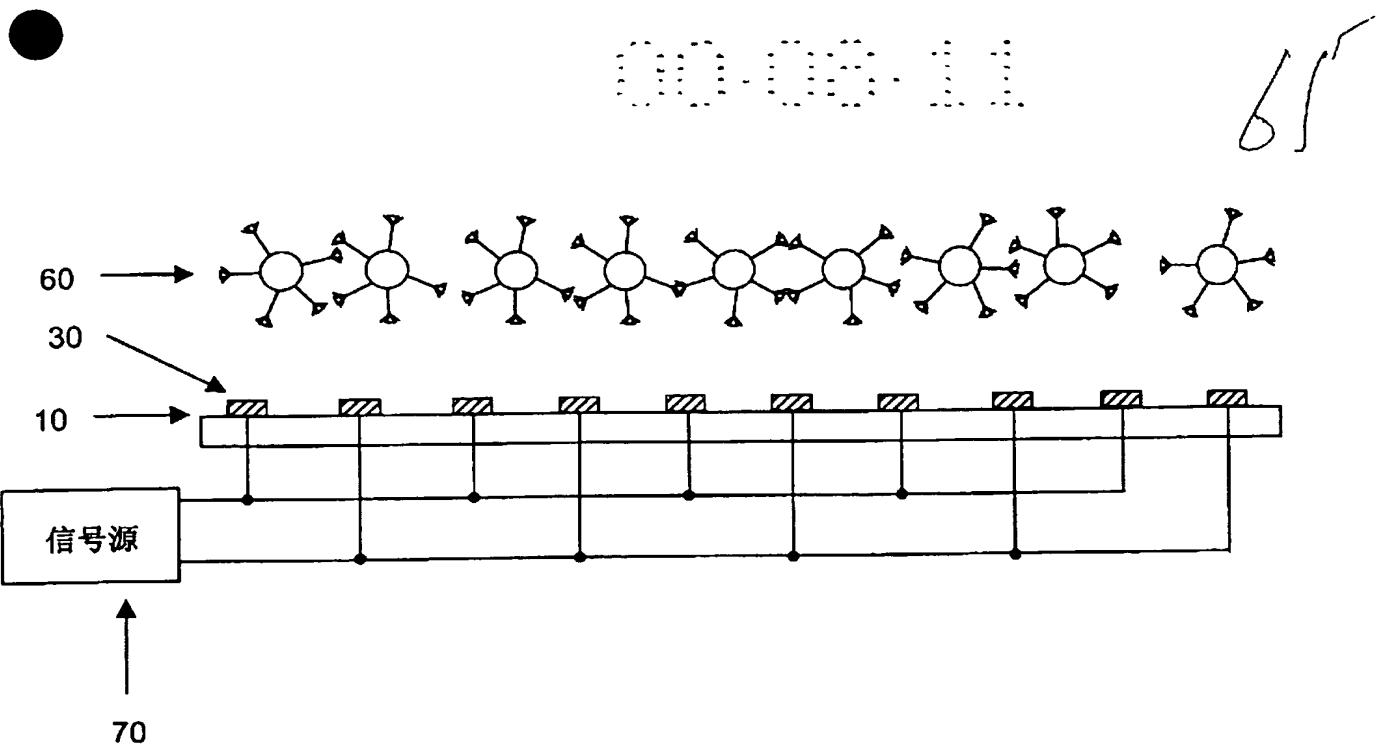


图 1(C)

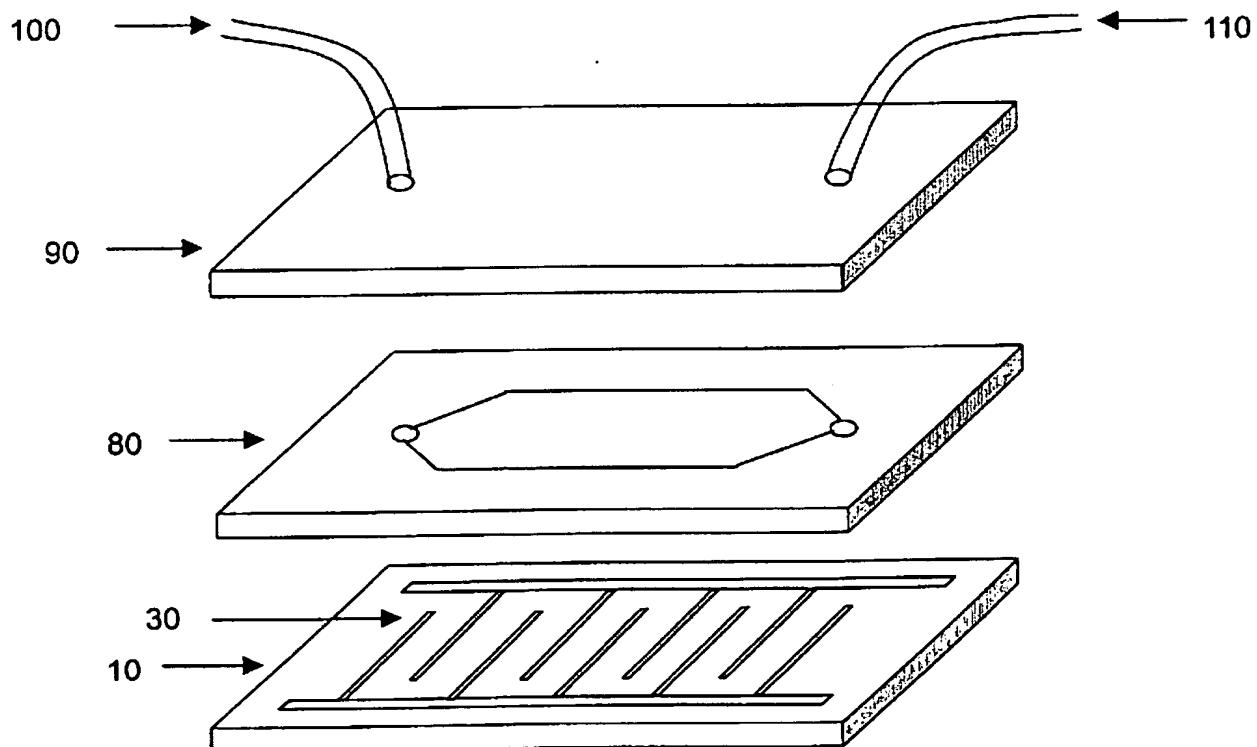


图 2

000-000-11

66

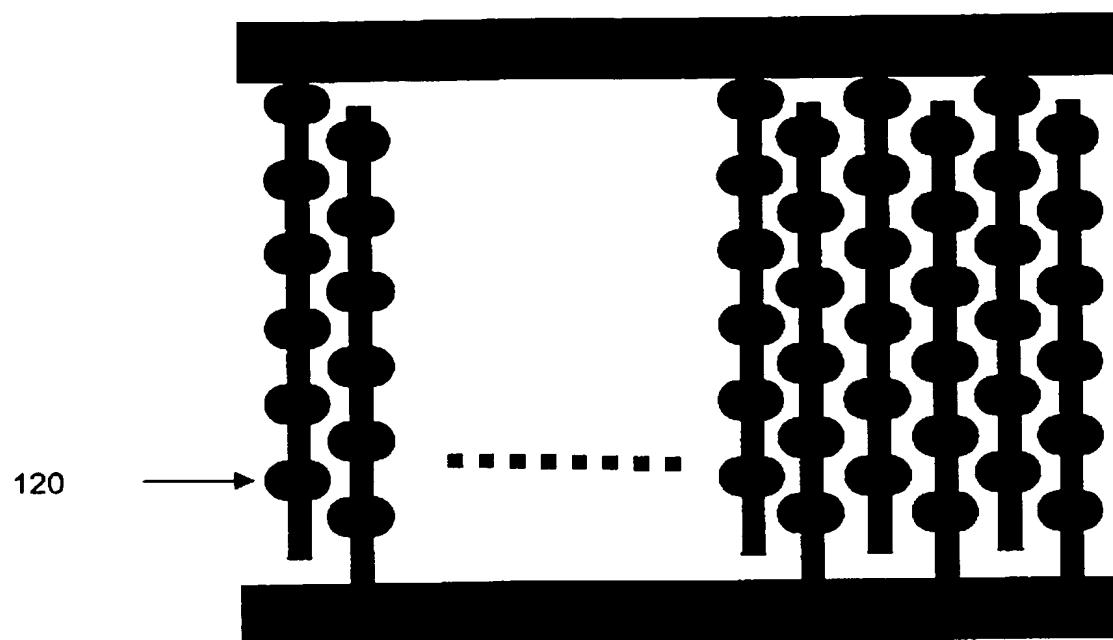


图 3(A)

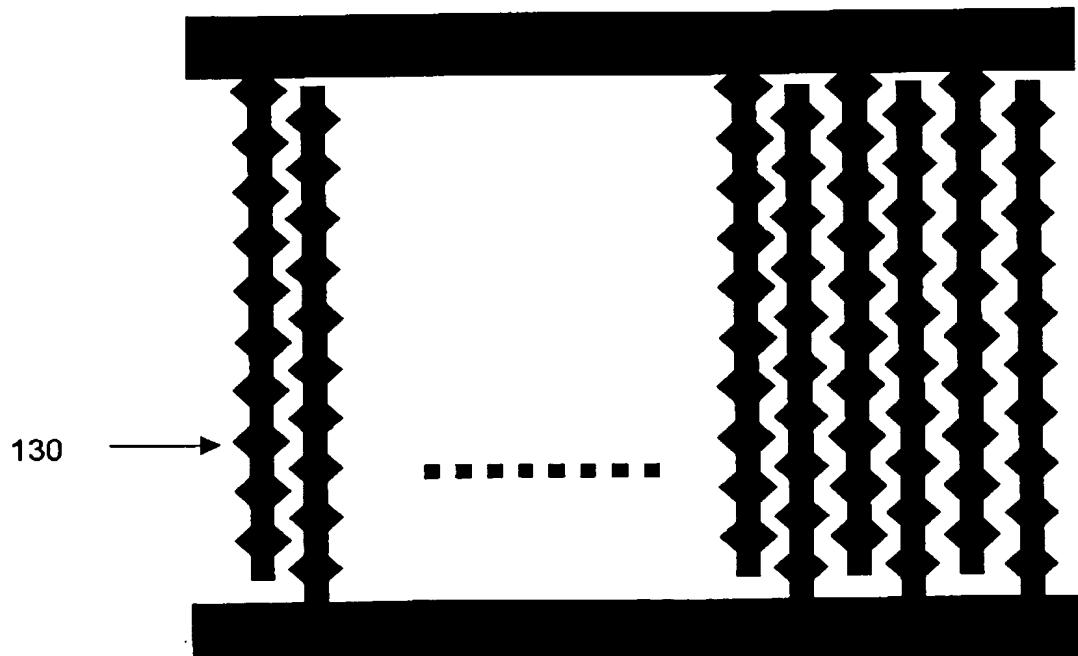


图 3(B)

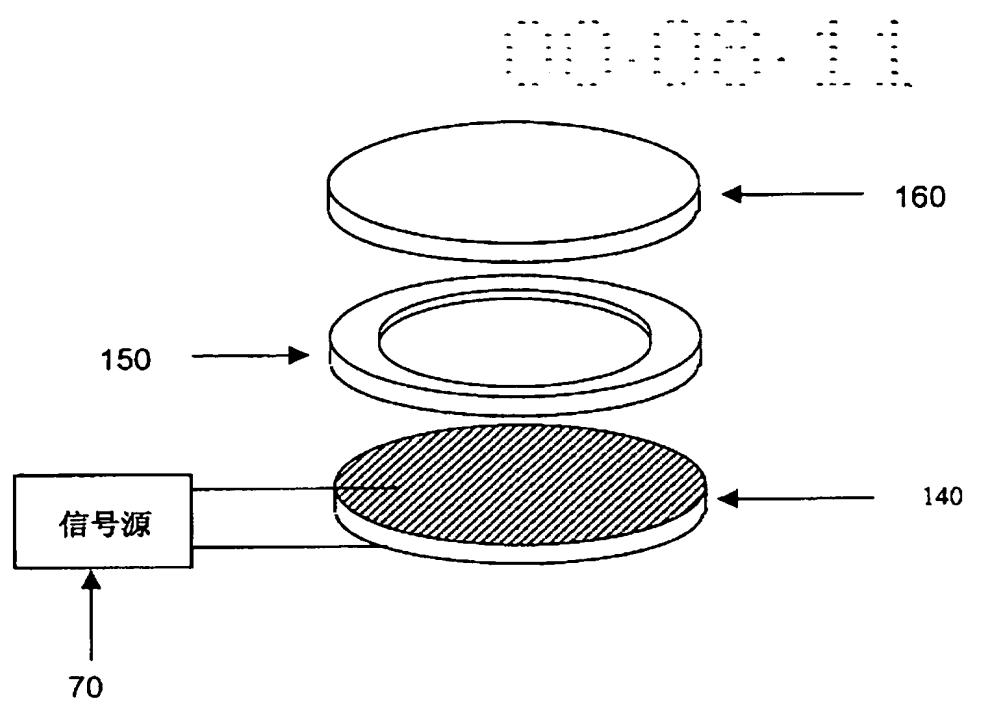


图 4

00-00-11

68

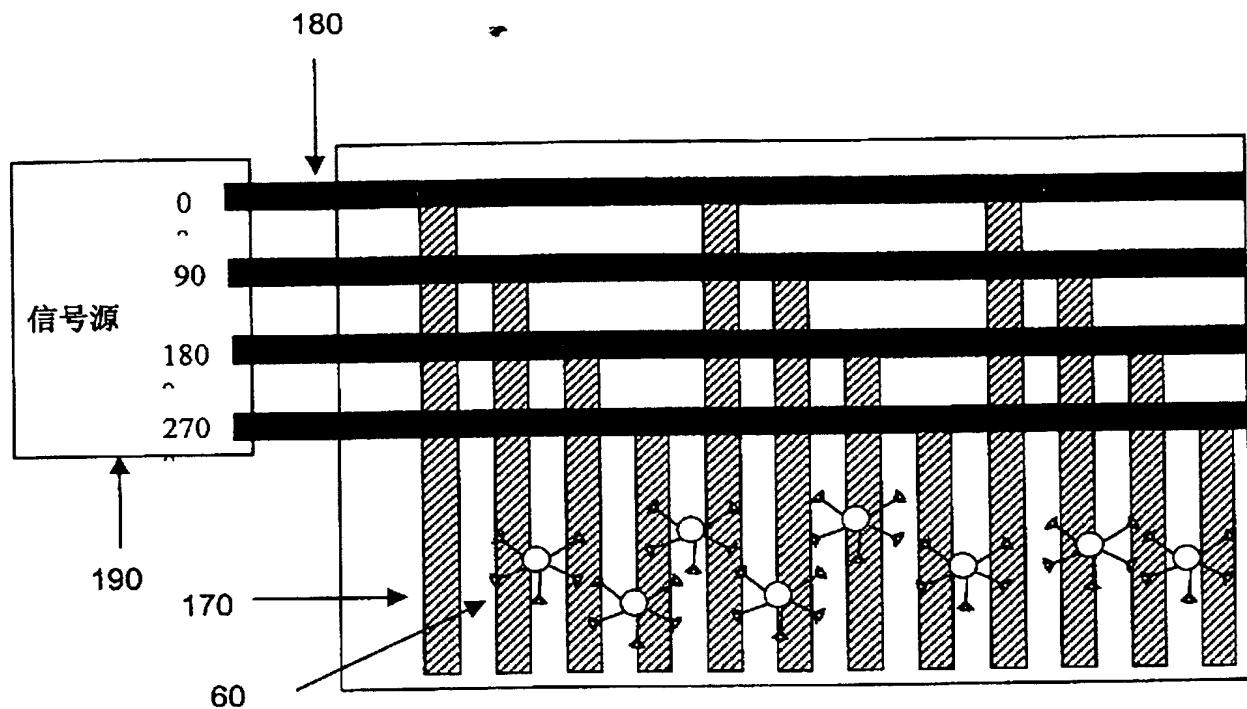


图 5(A)

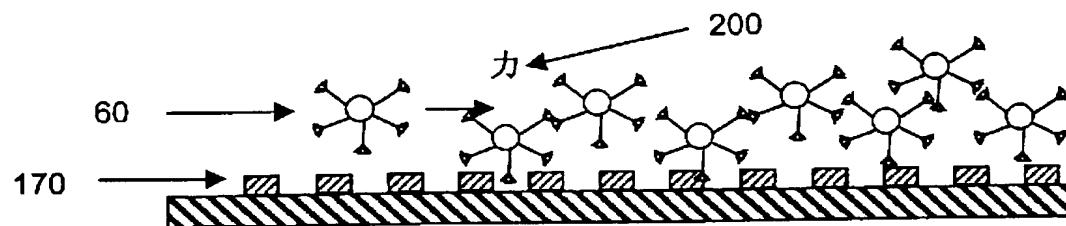


图 5(B)

00-00-11

68

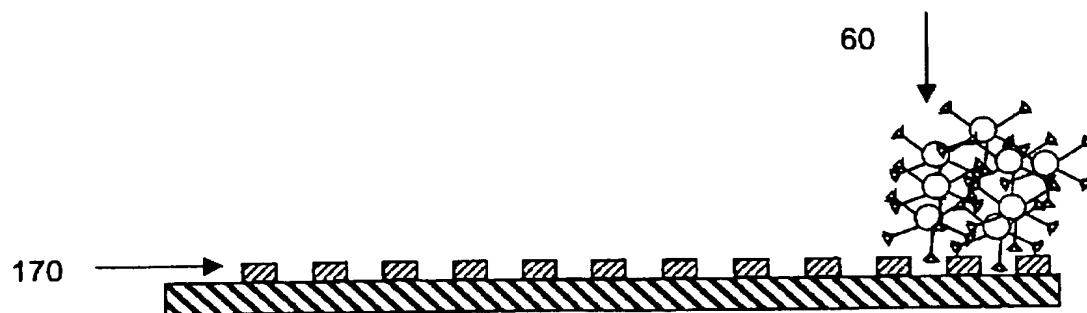


图 5(C)

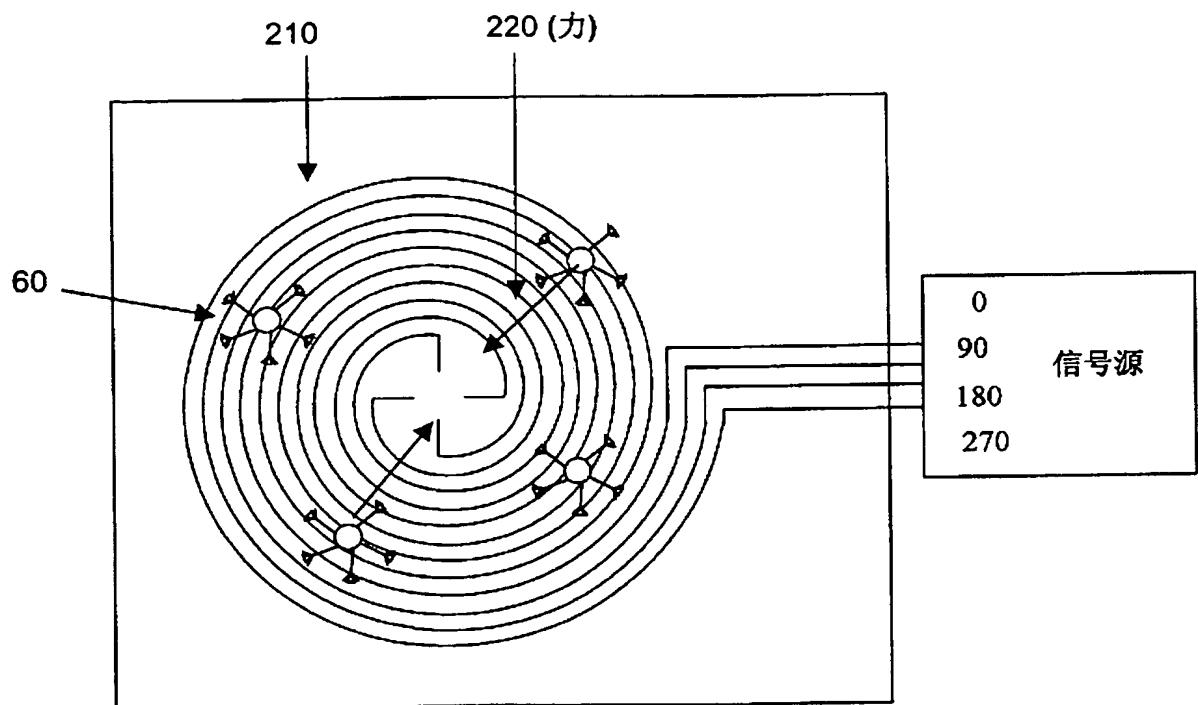


图 6

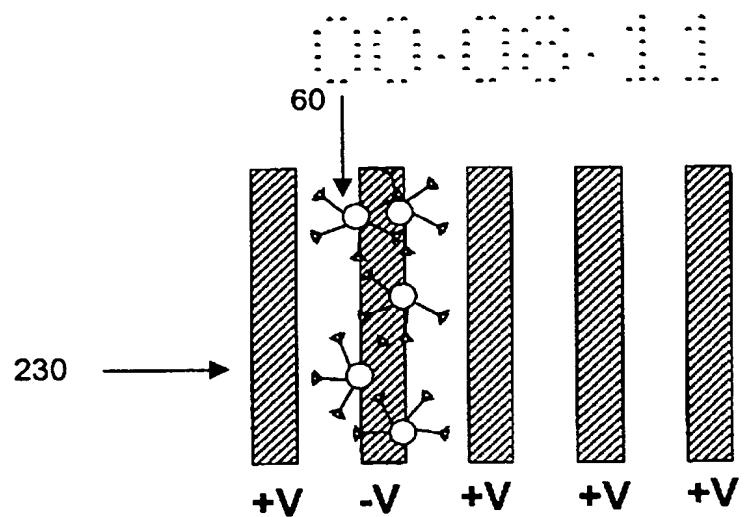


图 7(A)

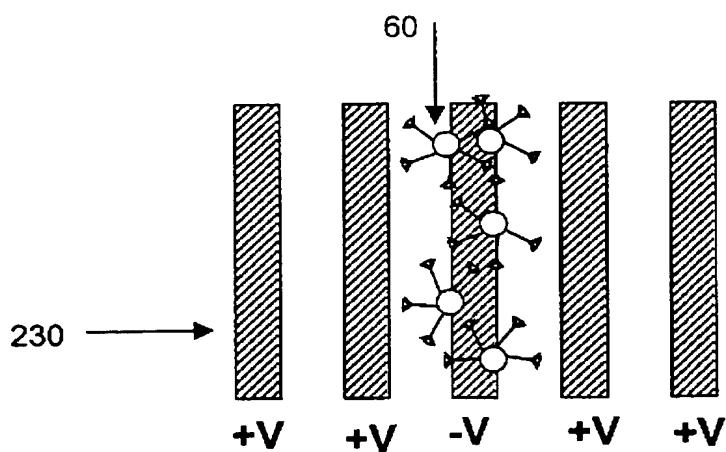


图 7(B)

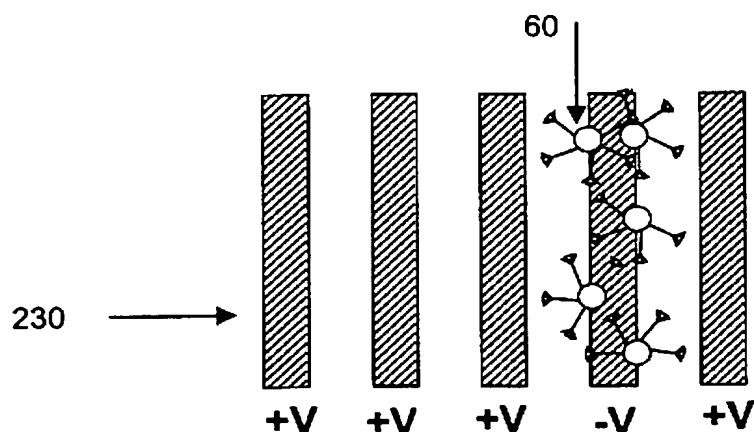


图 7(C)

00-00-11

7)

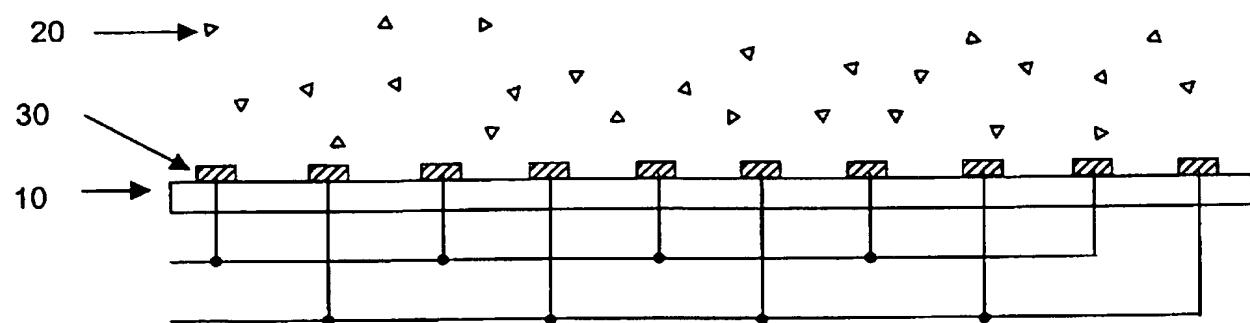


图 8(A)

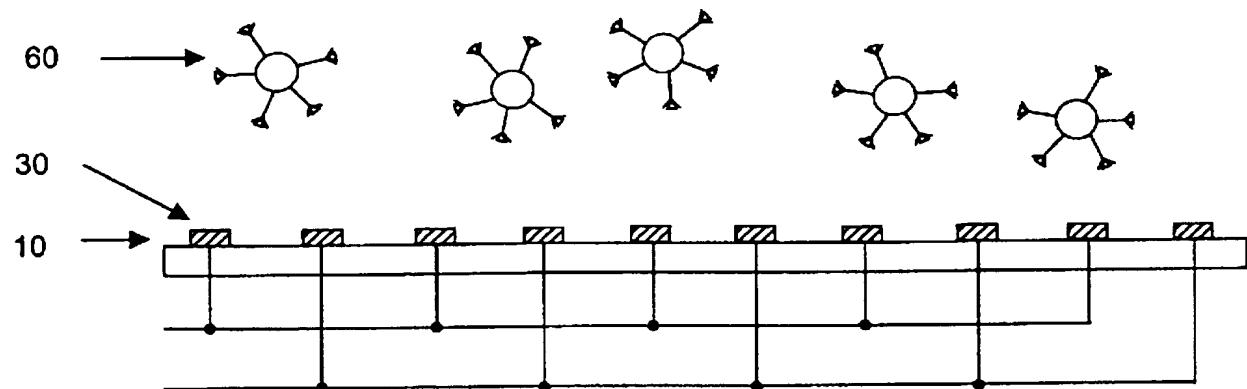


图 8(B)

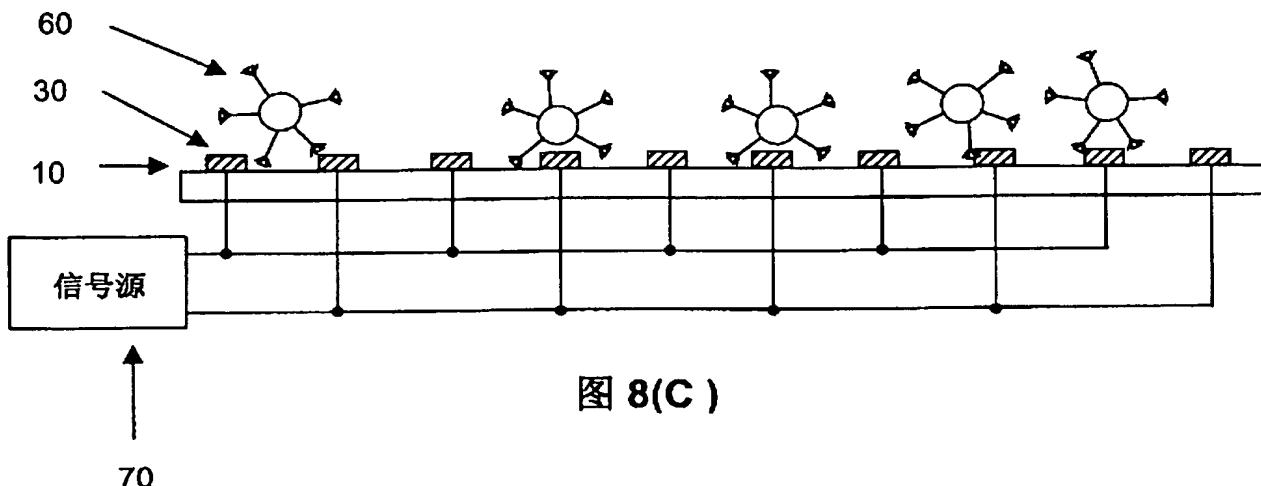


图 8(C)

00-06-11

72

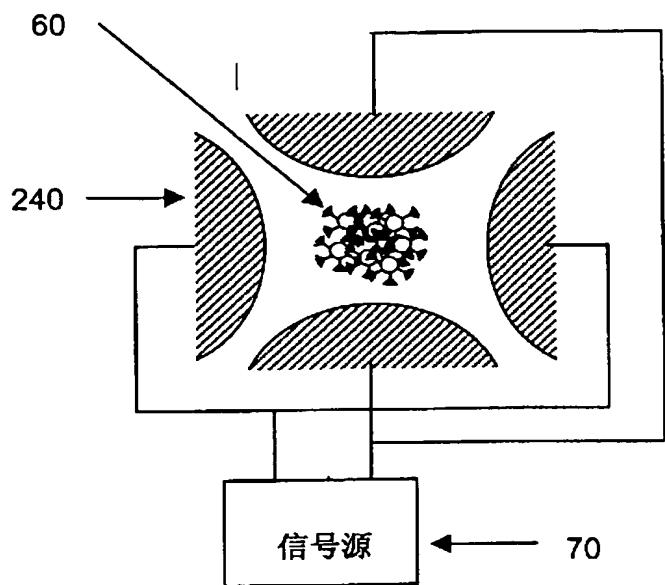


图 9(A)

00-06-11

73

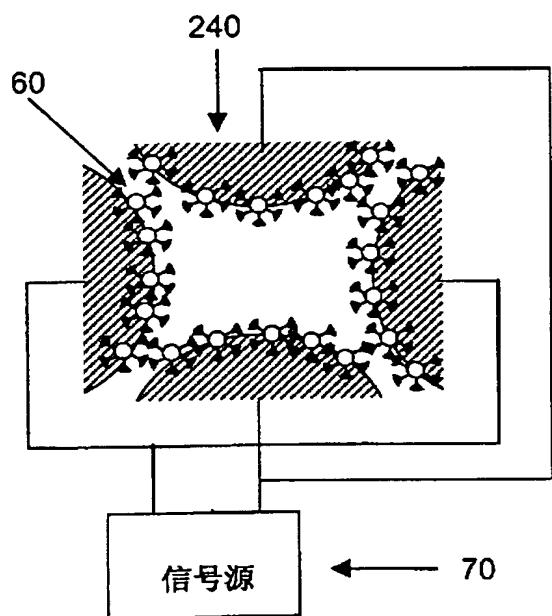


图 9(B)

000-000-111

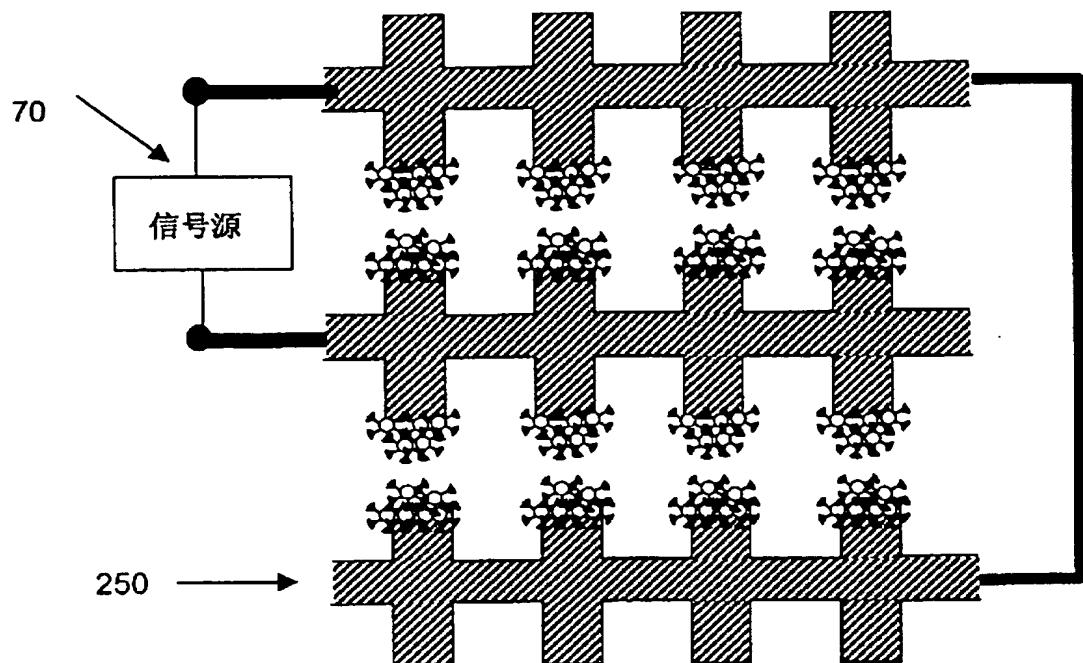


图 10(A)

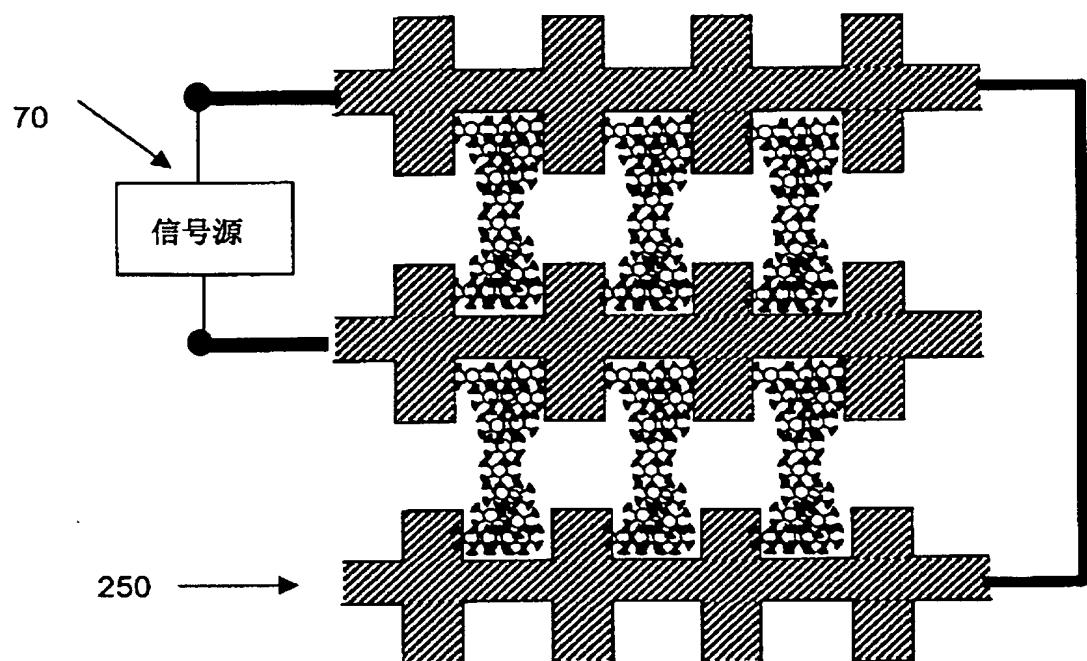


图 10(B)

00-000-11

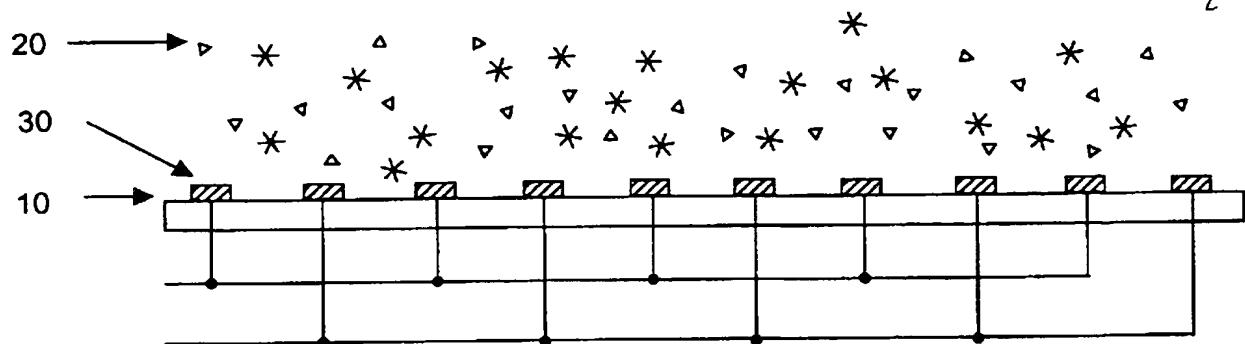


图 11(A)

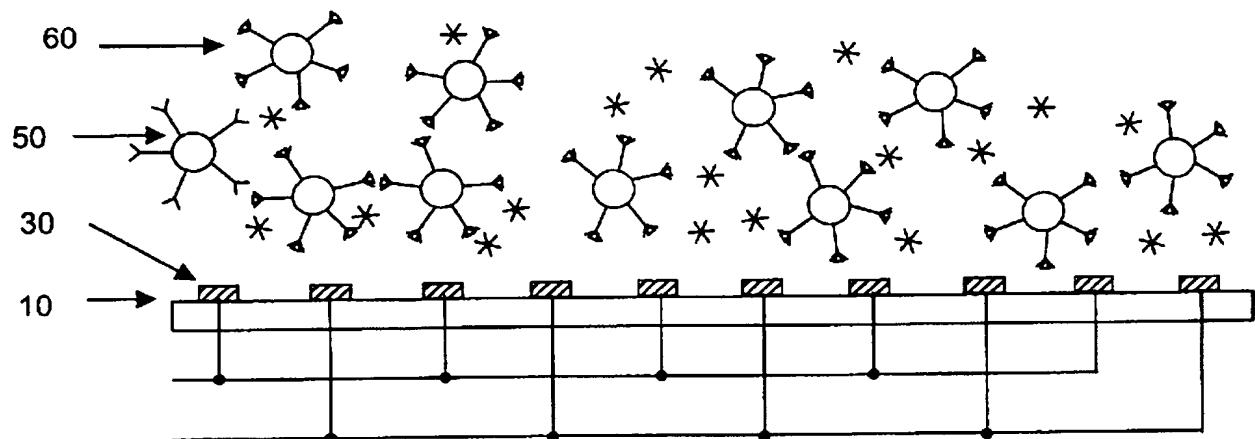


图 11(B)

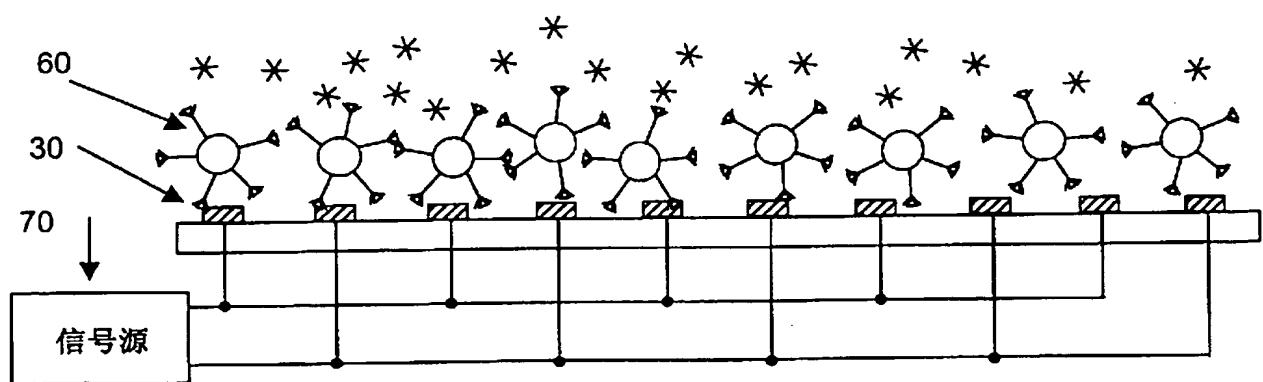


图 11(C)

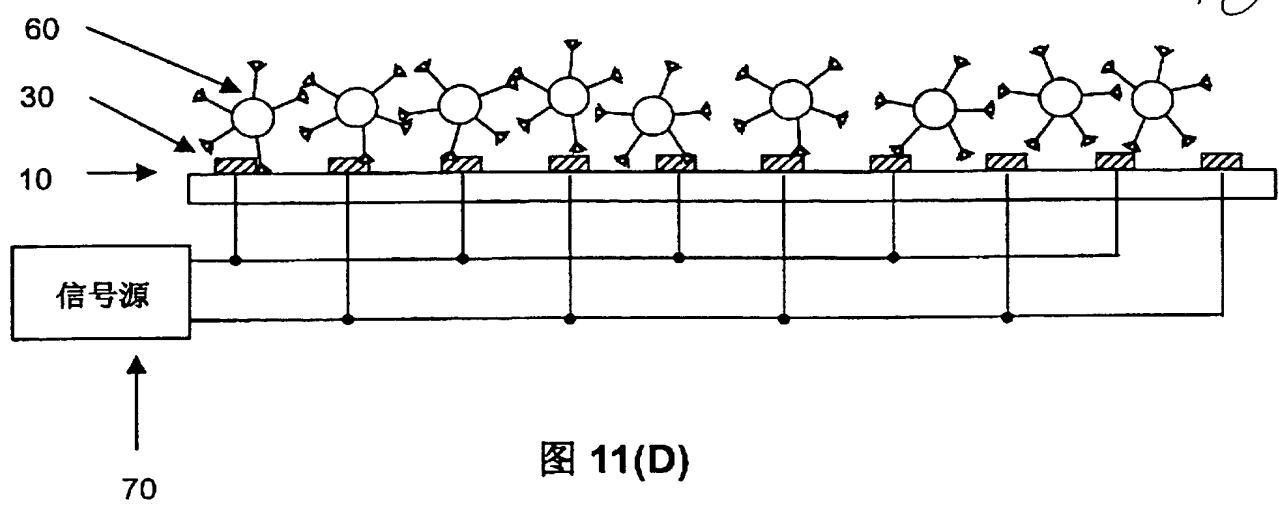


图 11(D)

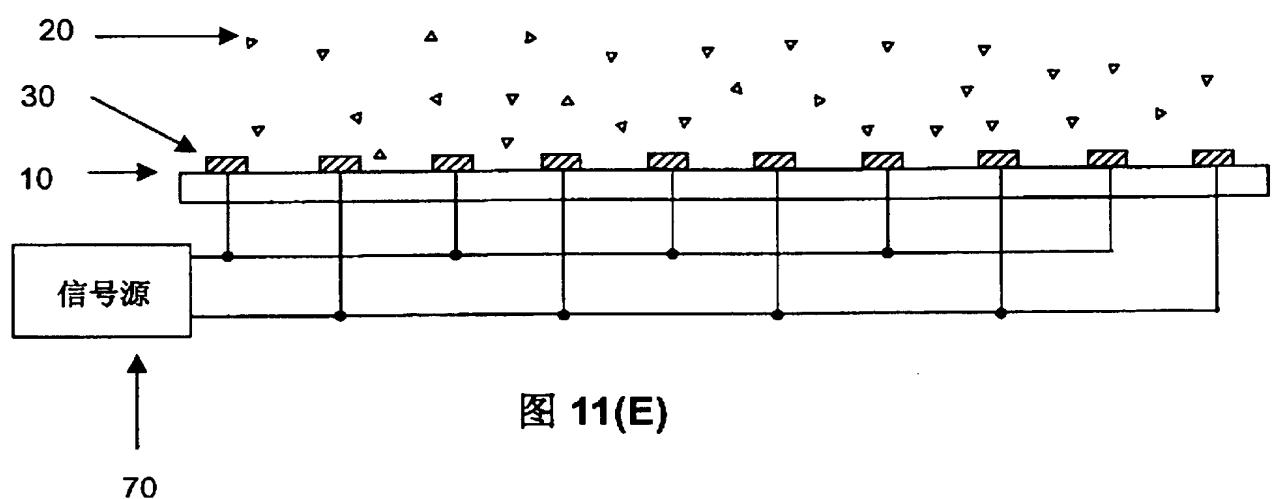


图 11(E)

00-00-11

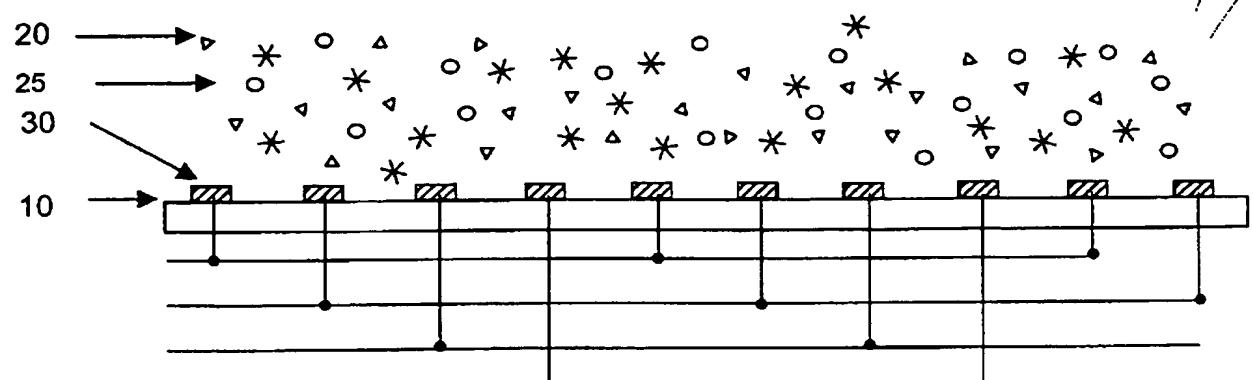


图 12(A)

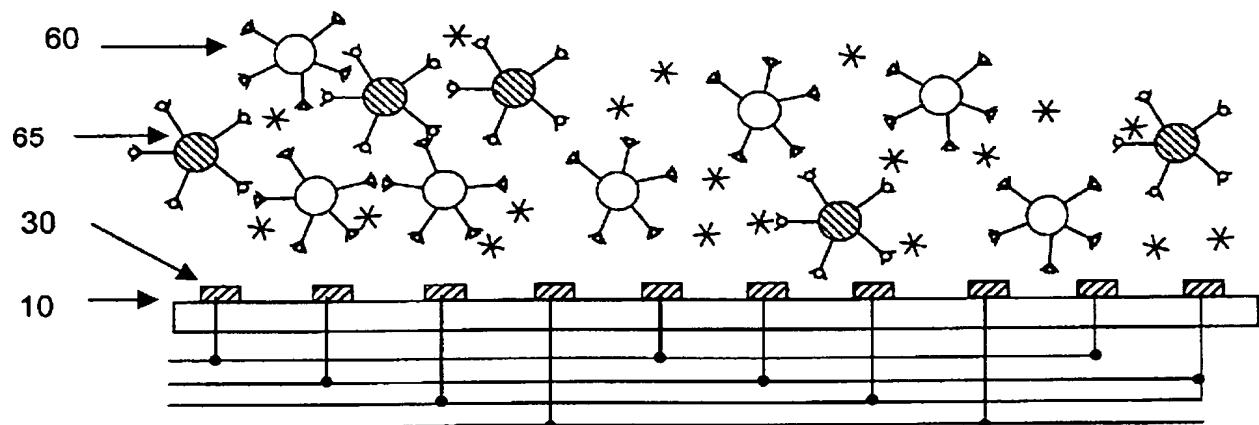


图 12(B)

000-000-11

78

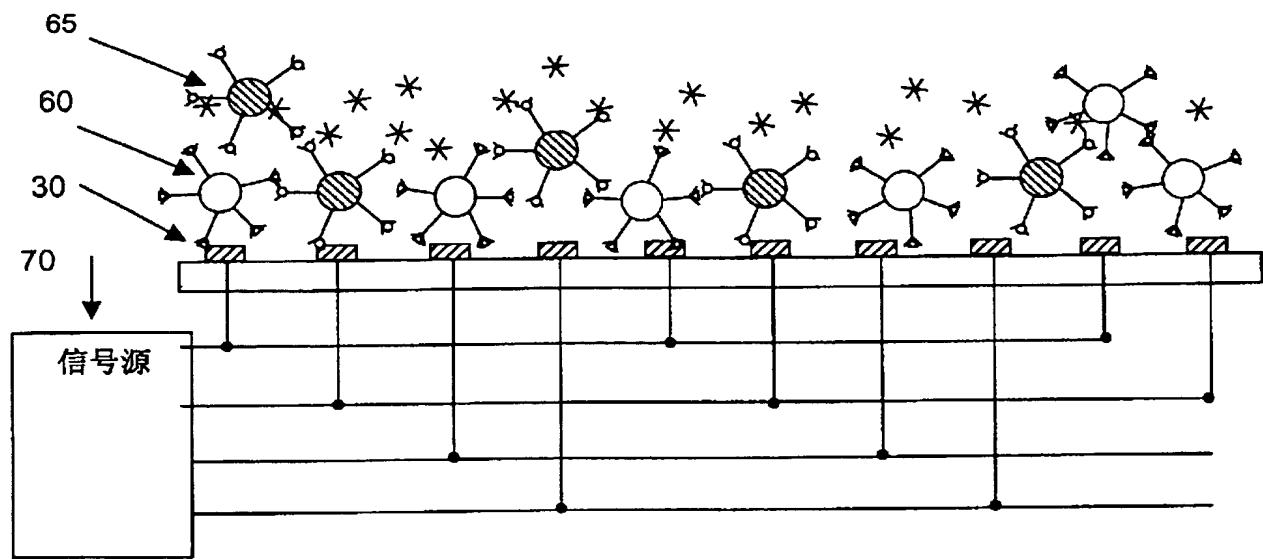


图 12(C)

000-000-11

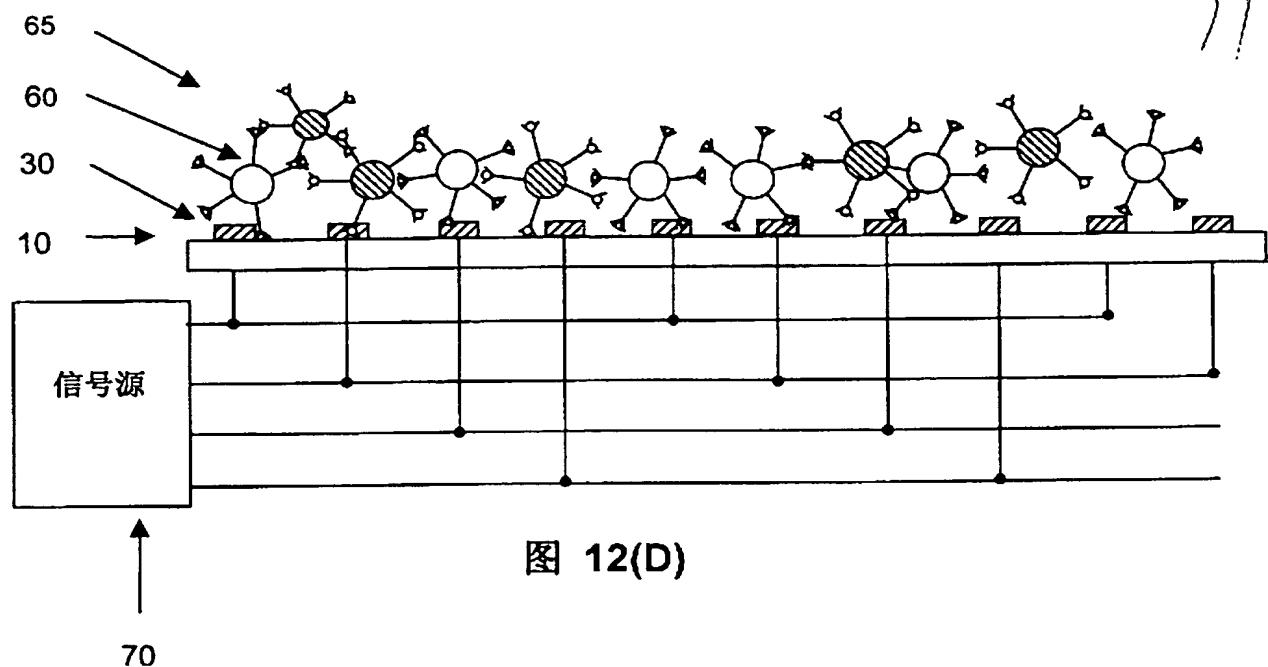


图 12(D)

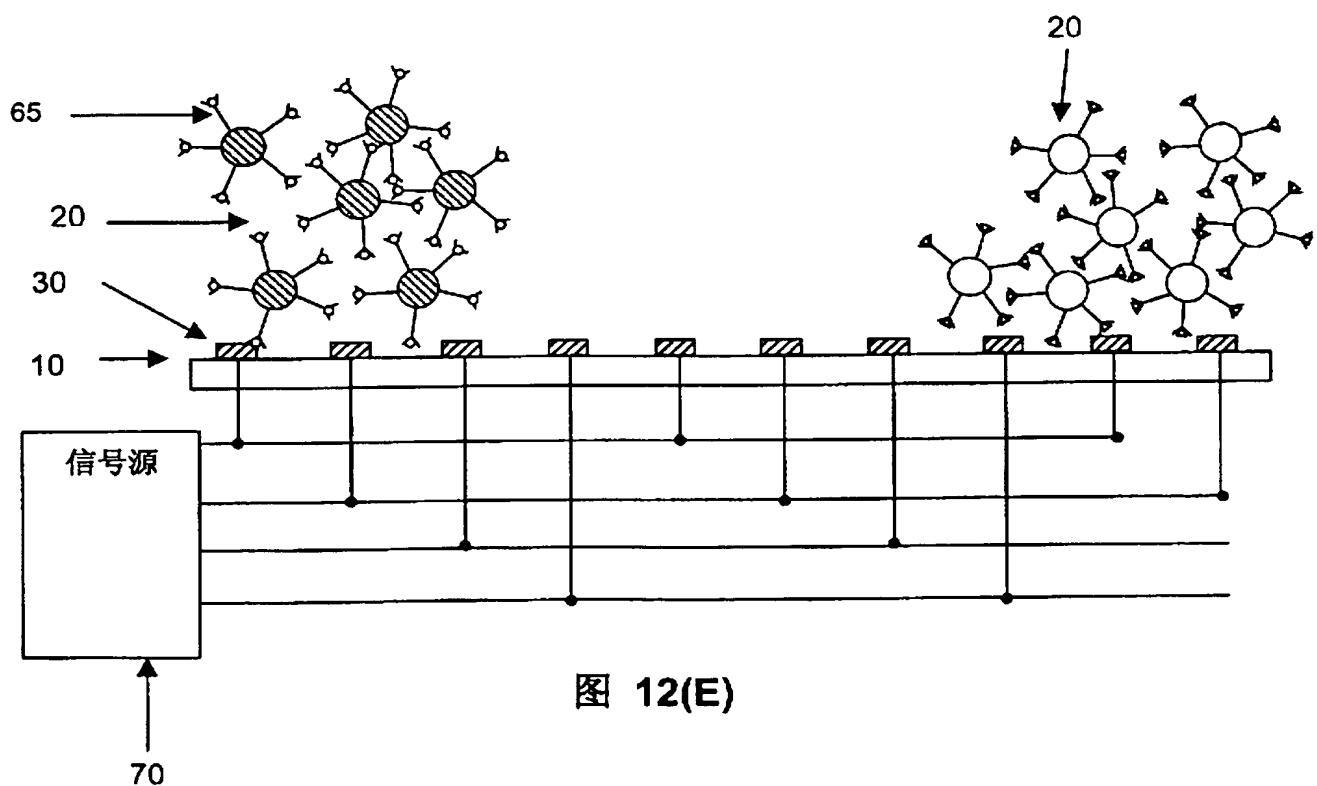


图 12(E)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.